

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST GRADO

**Composición química, actividad anti-Helicobacter pylori
y antioxidante del aceite esencial de Satureja brevicalyx
Epling "urqu muña**

TESIS

para optar al grado académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Mario Carhuapoma Yance

ASESOR

Pablo Bonilla Rivera

Lima – Perú

2007

*Al **ADN**, una de las misteriosas maravillas universales. Tal vez mutaríamos el gen egoísta, si tuviéramos la facultad.*

*A la Vía Láctea, por mantenerla en su ceno a la Tierra y ésta a los seres vivos, en especial a las plantas, inmenso biolaboratorio de diversos metabolitos biodinámicos, preceptora de la **VIDA**.*

*A mi **GRAN PROSAPIA**: Teofila, Rómulo, Sofía, Miriam, Rodrigo, Florisa, Pablo y Sonia.*

AGRADECIMIENTO

A través de una oración al **Ser Divino** que vive en nuestro instinto.

Al Dr. Pablo Bonilla R.

Por su valiosa asesoría y dedicación.

Al Dr. Raúl León B. y Dr. Robert H. Gilman, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Por su valiosa colaboración y dedicación.

A la Dra. Roser Vila, de la Universidad de Barcelona.

Por su permanente colaboración y apoyo.

A la Dra. Luz Oyola de Bardales, miembro del Jurado Informante.

A los miembros del Jurado Examinador y Calificador

Dr. Pedro Cotillo Zegarra

Dra. Eloísa Hernández Fernández

Dra. Nancy Lozano Reyes

Dr. Pablo Bonilla Rivera

Dra. Luzmila Troncoso Corzo

SUMARIO

RESUMEN

SUMMARY

RESUMO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
2.1. Antecedentes generales referentes a la especie	3
2.1.1. Taxonomía	3
2.1.2. Descripción botánica	3
2.1.3. Biodiversidad del género <i>Satureja</i>	3
2.1.4. Distribución geográfica	4
2.1.5. Antecedentes etnobotánicas y etnofarmacológicas	4
2.1.6. Investigaciones fitoquímicas	4
2.1.5. Investigaciones farmacológicas	4
2.2. <i>Helicobacter pylori</i> y radicales libres	5
2.2.1. <i>Helicobacter pylori</i>	5
2.2.2. Radicales libres	6
2.2.3. <i>Helicobacter pylori</i> y daño oxidativo	7
2.2.4. <i>Helicobacter pylori</i> y síntesis de óxido nítrico	7
2.3. Aceites esenciales	8
2.3.1. Actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> y antioxidante de aceites esenciales	8
III. PARTE EXPERIMENTAL	13
3.1. Materiales y métodos	13
3.1.1. Lugar de ejecución	13
3.1.2. Materiales, equipos y reactivos	13
3.1.3. Métodos	14
3.1.3.1. Obtención de la muestra	14
3.1.3.2. Procesamiento de la muestra	14
3.1.3.3. Obtención del aceite esencial	14
3.1.3.4. Determinación del rendimiento de aceite esencial	15
3.1.3.5. Determinación de las constantes físicas del aceite esencial	15
3.1.3.6. Elucidación estructural de los componentes químicos del AE	15
3.1.3.7. Evaluación de la citotoxicidad en <i>Artemia salina</i> Leach por	

el método de Anderson, Meyer y Thompson	16
3.1.3.8. Evaluación de la toxicidad aguda por el método de Dosis Fija	17
3.1.3.9. Evaluación de la actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> del AE	18
3.1.3.9.1. Aislamiento y activación de la cepa	18
3.1.3.9.2. Determinación de la actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> , método de Bauer-Kirby	18
3.1.3.9.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida	19
3.1.3.10. Actividad antioxidante	20
3.1.3.10.1. Método de la actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2- picrilhidrazilo	20
3.1.3.10.2. Método de la actividad secuestradora del radical hidroxilo	21
3.1.3.10.3. Actividad inhibidora de la lipoperoxidación lipídica microsomal	23
3.2. Análisis estadístico de resultados	24
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	48
VI. CONCLUSIONES	54
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
VIII. ANEXOS	

RESUMEN

El *Helicobacter pylori*, principal agente causal de la gastritis, condiciona el estrés oxidativo debido a la producción de radicales libres. La *Satureja brevicalyx*, es usada para tratar problemas gastrointestinales, como la gastritis. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los componentes químicos, la actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*. El aceite esencial reportó un rendimiento (1.80%v/p), rotación óptica (-2 a +4°), densidad (0.9047 g/mL) e índice de refracción (1.475). Mediante CG-SM y CG-FID se elucidó 35 compuestos al 97.1%: monoterpenos oxigenados (74.8%), como componentes mayoritarios la pulegona (27.2%), linalol (20.3%), mentona (11.1%), isomentona (8.3%), *cis*-isopulegona (2.7%), *trans*-isopulegona (0.9%), carvacrol (0.6%), timol (0.6%) y α -terpineol (0.5%); hidrocarburos sesquiterpénicos (16%), destacando biciclogermacreno (8.2%), β -cariofileno (6.5%) y bicicloelemeno (0.5%); hidrocarburos monoterpénicos (4.1%), con el p-cimeno (2.0%), limoneno (0.7%) y γ -terpineno (0.6%); y sesquiterpenos oxigenados (1.5%), con el espatulenol (0.8%). Por el método de *Artemia salina* mostró una bioactividad significativa, con una CL₅₀ de 13.35 μ g/mL, y por el método de Dosis Fija, en ratones albinos, presenta una DL₅₀ de 655.26 mg/kg, siendo ligeramente tóxica. Por el método de Difusión de Discos, tiene un efecto antibacteriano frente al *H. pylori*, con un halo de inhibición de 33.33 % en comparación con la amoxicilina a una concentración de 10 μ g/mL; por el método de Difusión en Microplacas, la concentración mínima inhibitoria es de 1.00 μ g/mL, y la concentración mínima bactericida de 2.00 μ g/mL. Se determinó en 3 modelos la actividad antioxidante a concentraciones de 10, 50 y 100 μ g/mL: 1) El aceite inhibió al radical DPPH en 67.76, 75.33 y 86.84%, frente al trolox que inhibió en 80.59, 87.17 y 93.09%; 2) secuestró al radical hidroxilo en 28.95, 51.57 y 76.84%; y 3) inhibió de la peroxidación lipídica en 16.4×10^{-8} , 9.8×10^{-8} y 8.5×10^{-8} moles x cm, comparado con el trolox que lo hizo en 14.9×10^{-8} , 8.0×10^{-8} y 7.5×10^{-8} moles x cm, frente a 53.9×10^{-8} moles x cm para el control negativo. Las estructuras químicas del aceite esencial de la *S. brevicalyx* justifican su actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante.

Palabras clave: *Satureja brevicalyx*, gastritis, radicales libres, anti-*Helicobacter pylori*, antioxidante.

SUMMARY

The *Helicobacter pylori* is the main causal agent of gastritis, it conditions the oxidative stress due to the fact that it produces free radicals. The *Satureja brevicalyx* is used to treat gastrointestinal problems as gastritis. The objective of this work was to characterize the chemical components, the anti-*Helicobacter pylori* activity and the antioxidant of the main oil of *Satureja brevicalyx*. The main oil reported a performance (1.80%v/p), optical rotation (- 2 to + 4°), density (0,9047 g/mL) and index of refraction (1.475). By means of CG-SM and CG-FID elucidated 35 compounds at 97,1%: oxygenated monoterpenes (74,8%) as majority compound the pulegone (27,2%), linalool (20,3%), menthone (11,1%), isomenthone (8,3%), cis-isopulegone (2,7%), trans-isopulegone (0,9%), carvacrol (0,6%), thymol (0,6%) and α -terpineol (0,5%); sesquiterpenes hydrocarbons (16%), emphasizing bicyclogermacrene (8,2%), β -caryophyllene (6,5%) and bicycloelemene (0,5%); monoterpene hydrocarbons (4,1%), with the p-cymene (2,0%), limonene (0,7%) and γ -terpinene (0,6%); and sesquiterpenes (1,5%), with eucalyptol (0,8%). By the method of *Artemia salina* it showed a significant bioactivity, with a CL_{50} of 13,35 μ g/mL, and by the method of Fixed Dose, in albinae mice shows a DL_{50} of 655,26 mg/kg being slightly toxic. By the method of the Diffusion of Discs, it has an antibacterial effect of the *H. pylori*, with an halo of inhibition of 33,33% in comparison with the amoxiciline in a concentration of 10 μ g/mL; by the method of Diffusion in Microplacas, the minimum inhibitory concentration is of 1,00 μ g/mL, and the minimum bactericide concentration is of 2,00 μ g/mL. The antioxidant activity to concentrations was determined in three models the concentrations must be of 10, 50 and 100 μ g/mL: 1) The oil inhibited the radical DPPH in 67,76, 75,33 and 86,84%, in relation with trolox which inhibited in 80,59, 87,17 and 93,09%; 2) kidnapped the hydroxyl radical in 28,95, 51,57 and 76,84%; and 3) inhibited the lipidic peroxidation in 16.4×10^{-8} , 9.8×10^{-8} and 8.5×10^{-8} moles \times cm, in relation with trolox which inhibited in 14.9×10^{-8} , 8.0×10^{-8} and 7.5×10^{-8} moles \times cm, in relation to a 53.9×10^{-8} moles \times cm for the negative control. The chemical structures of the main oil of the *S. brevicalyx* justify its activity as an anti-*Helicobacter pylori* and as an antioxidant.

Key words: *Satureja brevicalyx*, gastritis, free radicals, anti-*Helicobacter pylori*, antioxidant.

RESUMO

O *Helicobacter pylori*, principal agente causador da gastrite, provoca o estresse oxidativo devido à produção de radicais livres. A *Satureja brevicalyx*, é usada para tratar problemas gastrointestinais, como a gastrite. O objetivo do presente trabalho é caracterizar os componentes químicos, a atividade anti-*Helicobacter pylori* e antioxidante do óleo essencial da *Satureja brevicalyx*. O óleo essencial indicou rendimento (1,80%v/p), rotação óptica (-2 a +4°), densidade (0,9047 g/mL) e índice de refração (1,475). Mediante CG-SM e CG-FID foram descobertos 35 compostos em 97,1% os monoterpenos oxigenados (74,8%). Como componentes majoritários a pulegona (27,2%), linalol (20,3%), mentona (11,1%), isomentona (8,3%), *cis*-isopulegona (2,7%), *trans*-isopulegona (0,9%), carvacrol (0,6%), timol (0,6%) e α -terpineol (0,5%); hidrocarburos sesquiterpênicos (16%), destacando biciclogermacreno (8,2%), β -cariofileno (6,5%) e bicicloelemeno (0,5%); hidrocarburos monoterpênicos (4,1%), com p-cimeno (2,0%), limoneno (0,7%), γ -terpineno (0,6%); sesquiterpenos oxigenados (1,5%), e o espatulenol (0,8%). O uso de *Artemia salina* apresentou uma bioatividade significativa, com uma CL₅₀ de 13,35 μ g/mL, e com o uso de Dose Fixa em ratos albinos, apresentou uma DL₅₀ de 655,26 mg/kg, sendo ligeiramente tóxica. O método de Difusão de Discos, apresentou um efeito antibacteriano frente ao *H. pylori*, com um halo de inibição de 33,33 % em comparação com a amoxicilina em uma concentração de 10 μ g/mL; pelo método de Difusão em Microplacas, a concentração mínima inibidora é de 1,00 μ g/mL, e a concentração mínima bactericida de 2,00 μ g/mL. Determinou-se, através de 3 modelos, a atividade antioxidante em concentrações de 10, 50 e 100 μ g/mL: 1) O óleo bloqueou o radical DPPH em 67,76, 75,33 e 86,84%, frente ao trolox que bloqueou em 80,59, 87,17 e 93,09%; 2) isolou o radical hidroxila em 28,95, 51,57 e 76,84%; e 3) bloqueou a peroxidação lipídica em $16,4 \times 10^{-8}$, $9,8 \times 10^{-8}$ e $8,5 \times 10^{-8}$ moles x cm, comparado com o trolox que o fez em $14,9 \times 10^{-8}$, $8,0 \times 10^{-8}$ e $7,5 \times 10^{-8}$ moles x cm, frente a $53,9 \times 10^{-8}$ moles x cm para o controle negativo. As estruturas químicas do óleo essencial da *S. brevicalyx* justificam sua atividade anti-*Helicobacter pylori* e antioxidante.

Palavras-chave: *Satureja brevicalyx*, gastrite, radicais livres, anti-*Helicobacter pylori*, antioxidante.

I. INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori*, es una bacteria que invade la capa mucosa del estómago, a nivel del antro pilórico, resiste a los efectos del jugo gástrico y del ácido clorhídrico debido a su enzima ureasa y otros mecanismos de defensa.

La presencia y los efectos de *H. pylori* a nivel del estómago condicionan la gastritis crónica, conllevando a la producción de radicales libres, las cuales inician la lipoperoxidación de las membranas celulares y afección a nivel de biomoléculas como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, generando mutaciones del ADN y el cáncer gástrico.

En los países en vías de desarrollo existen una alta prevalencia de infección por *H. pylori*, iniciándose desde la niñez, por el déficit de agua potable, la higiene y otros factores correlacionantes. Los esquemas de tratamientos con antibióticos no son suficientes, muchas de ellas están generando resistencia antibacteriana, además de generar efectos colaterales y secundarios.

Las informaciones etnofarmacológicas, han propuesto diversas especies vegetales con propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes, como la *Satureja brevicalyx*, que por las serranías del Perú son usadas para tratar problemas de gastritis y otras afecciones gastrointestinales.

La *S. brevicalyx* es una planta aromática que contiene, como parte de sus metabolitos secundarios, aceites esenciales, sustancias que en su mayoría están compuestos por monoterpenos y sesquiterpenos; conteniendo grupos funcionales de tipo fenólico, como el timol y carvacrol, que son antimicrobianos de primer orden; alcoholes, como linalol y α -terpineol, antimicrobianos de segundo orden; y compuestos cetónicos, como pulegona, mentona, isomentona, *cis*-isopulegona, *trans*-isopulegona, etc, antimicrobianos de tercer orden.

Los aceites volátiles, contienen estructuras químicas de tipo fenólico (timol, carvacrol, eugenol, vainillina). Son conocidos que los compuestos fenólicos poseen actividad antioxidante, ya que tienen grupos hidroxilo e insaturaciones que permiten interactuar con los electrones desapareados de los radicales libres, neutralizándolos de su alta reactividad tóxica.

El presente trabajo pretende validar las propiedades farmacológicas del aceite esencial de la ***Satureja brevicalyx***, planteándose el siguiente objetivo: Caracterizar los componentes químicos del aceite esencial de la ***Satureja brevicalyx***, determinar su actividad anti-***Helicobacter pylori*** y antioxidante.

II. GENERALIDADES

2.1. ANTECEDENTES GENERALES DE LA ESPECIE

2.1.1. Taxonomía

Según el sistema de clasificación de A. Cronquist (1981)^[1,2], la especie se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
Sub- CLASE	: Asteridae
ORDEN	: Limiales
FAMILIA	: Lamiaceae
GÉNERO	: <i>Satureja</i>
ESPECIE	: <i>Satureja brevicalyx</i> Epling

Sinonimia vulgar : “urqu muña”, “wayra muña”, “sacha muña”, “muña”, “inca muña”, “salqa muña” “cjunumuña”, “cjuña”, “konoc” y “orégano de los incas”^[3,4].

2.1.2. Descripción botánica

Es de porte arbustiva perennifolio, erguido de 1.0-1.5m de altura, aromática y pubescente. Hojas muy pequeñas, espatuladas, sésiles, verticiladas y opuestas, de margen entero. Flores blancas, solitarias, axilares, tetrámeras, bilabiadas; cáliz gamosépalo; corola gamopétala; androceo con estambres didínamos; gineceo con ovario súpero, estilo apical y estigma simple. Florece en primavera y verano^[3,4] (figura 1 y 2, anexo).

2.1.3. Biodiversidad del género *Satureja*

El género *Satureja* cuenta con unas 200 especies en el mundo, todas estas especies son de regiones templadas y tropicales de ambos hemisferios de la Tierra. En el Perú se han identificado unas 26 especies, de las cuales 20 son endémicas. La ***Satureja brevicalyx*** es una especie endémica de las regiones altoandinas sureñas del Perú^[2-5].

2.1.4. Distribución geográfica

La ***S. brevicalyx*** crece en la parte sur andina del Perú (Ayacucho, Apurímac, Cuzco y Puno), entre las altitudes de 3300 – 3800 msnm, es de predilección por laderas de suelos areno-arcillosos y pedregosos^[2-5].

2.1.5. Antecedentes etnobotánicas y etnofarmacológicas

Según informaciones etnobotánicas y etnofarmacológicas es usada para resolver problemas gastrointestinales y para la corrección de desordenes menstruales. Es digestivo, carminativo, contra la gastritis, flatulencia y antiespasmódica. También es usado como analgésico soasando las hojas en caso de dolores musculares y tortícolis^[3,4,6].

2.1.6. Investigaciones fitoquímicas

El extracto hidroalcohólico evidencia los siguientes metabolitos: resinas, azúcares reductores, catequinas, lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, flavonoides y aceite esencial^[4,6].

2.1.6. Investigaciones farmacológicas

Según Soto (1999)^[6], determinó la actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto hidroalcohólico de ***S. brevicalyx*** en 400 mg/kg de peso, aproximando tal actividad a la del ácido acetilsalicílico y estando por debajo del ketorolaco.

Díez (2002)^[7], determinó la actividad antiespasmódica sobre el intestino aislado de cobayo de una infusión acuosa al 5% de hojas y sumidades floridas de ***S. brevicalyx***, mostrando una ligera acción antiespasmódica frente a la N-butilbromuro de hioscina.

Palomino (2005)^[8], concluye que el extracto acuoso liofilizado de las hojas de ***S. brevicalyx*** posee capacidad de captación de radicales libres, en relación a la vitamina C. Además no existe diferencia estadísticamente significativa en los niveles de lipoperoxidación, glutatión y proteínas hepáticas, utilizados como medida de estrés oxidativo.

2.2. HELICOBACTER PYLORI Y RADICALES LIBRES

2.2.1. *Helicobacter pylori*

H. pylori es un bacilo gram negativo y microaerófilico. Presenta de 4 a 6 flagelos unipolares o bipolares recubiertos por una vaina y ensanchados en su extremo distal de diámetros entre 0,5 a 1,0 micra y de 2,5 a 4,5 micras de longitud. Ingresa por la boca del tubo digestivo y mediante los flagelos puede moverse en un medio de gran viscosidad, hasta ubicarse en la superficie de la capa de *mucus* que recubre las células epiteliales de la mucosa gástrica, del *fundus* y el antro pilórico preferiblemente, a donde se adhiere por medio de adhesinas. También puede colonizar al hospedero situándose entre las uniones intercelulares^[9-11].

H. pylori no posee capacidad invasiva pues no se observa en forma intracelular, sin embargo, es capaz de provocar daño epitelial debido fundamentalmente a su batería enzimática. La ureasa, una de sus principales enzimas, es imprescindible en el proceso de colonización de la mucosa gástrica; hidroliza la urea en amonio y CO₂, esto proporciona un pH casi neutro a su alrededor, que le permite evadir las propiedades bactericidas del ácido clorhídrico^[11]. Las altas concentraciones de amonio alteran la biosíntesis del *mucus* gástrico, y recientemente se ha planteado que puede proporcionar una energía adicional, la cual favorece la motilidad de los flagelos por la generación de un potencial de membrana^[12]. Unido a esto, las fosfolipasas hidrolizan las membranas celulares que liberan lisolecitinas, las cuales constituyen un factor ulcerogénico. Por su parte, los tetrapéptidos bacterianos y las enzimas mucinasa, lipasa y fosfolipasa ejercen un importante efecto quimiotáctico sobre eosinófilos y neutrófilos, lo cual facilita su reclutamiento y proliferación^[12]. Estas células al activarse provocan la liberación de citocinas, que posibilitan el desarrollo de una respuesta inflamatoria, la cual lesiona aún más la mucosa mediante la liberación de mediadores inflamatorios como los metabolitos del ácido araquidónico, los radicales libres del oxígeno y los factores activadores de plaquetas, que junto con el microorganismo inducen la expresión de otros receptores para la liberación de interleucina 1, algunos factores de crecimiento celular y los radicales libres oxidantes^[13-17].

El *H. pylori* induce la producción de radicales libres, que afectan a las células epiteliales del estómago, ocasionando el estrés oxidativo, atacando a sus macromoléculas como los lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, conllevando a una úlcera y carcinogénesis^[18-25].

2.2.2. Radicales libres

Un radical libre es cualquier especie química ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados en el orbital más externo^[26].

Estos electrones generan un campo eléctrico que no es anulado, lo que ocasiona que la especie química sea paramagnética y por ende altamente reactiva, capaces de actuar en los sistemas biológicos dañándolos irreversiblemente^[26].

El estrés oxidativo es la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno^[27].

Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado. El estrés oxidativo ocasiona el daño oxidativo, ésta última ocasiona un estado patológico y la muerte celular^[27].

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), pueden generar carcinogénesis por su capacidad de reaccionar con el DNA y causar mutaciones. Recientemente se ha sugerido que el óxido nítrico y sus derivados producidos en tejidos inflamados, como la gastritis, pueden contribuir al proceso de carcinogénesis^[24].

2.2.3. *Helicobacter pylori* y daño oxidativo

La alteración histológica más evidente en la mucosa gástrica, inducida por la presencia del *H. pylori*, es la respuesta inflamatoria, cuya actividad depende de la capacidad de respuesta del hospedero y de la actividad

bacteriana^[28]. En los procesos inflamatorios, diferentes fagocitos, tales como neutrófilos, macrófagos y eosinófilos generan radicales libres en respuesta a mediadores pro-inflamatorios y productos de la pared celular bacteriana^[29].

Las ERO y ERN, generados en el proceso inflamatorio reaccionan con el DNA y pueden inducir alteración de la expresión de proto-oncógenes^[30], o bien como generar productos genotóxicos como 8-hidroxinonanal o malondialdehído, capaces de interactuar con blancos moleculares en el DNA, o pueden convertir pro-carcinógenos en cancerígenos^[30].

La inestabilidad genómica demostrada por la inestabilidad de microsatélites (MSI) es observada en 13 – 44% de los casos de cáncer gástrico. La mayoría de los MSI de alto nivel es asociado a defectos del sistema de reparo^[31], que pueden ser inducidos por radicales libres de oxígeno^[32,33].

Baik (1996)^[34], encontró altos niveles de daños oxidativos en el DNA de células de la mucosa gástrica en la fase precoz de infección por el *H. pylori*. Este resultado favorece la hipótesis de que la infección por *H. pylori* sea el denominador común entre la gastritis crónica y el carcinoma gástrico.

2.2.4. *Helicobacter pylori* y síntesis de óxido nítrico

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno pueden tener importante papel en la carcinogénesis gástrica por inducir daño en el DNA directa o indirectamente. Las especies reactivas de nitrógeno son derivados de la síntesis de óxido nítrico e inducidos por las citocinas liberadas por las células mononucleares de la inflamación^[35]. Pacientes infectados por el *H. pylori* presentan altos niveles de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)^[36].

El óxido nítrico puede favorecer la acumulación de mutaciones potencialmente oncogénicas por mecanismos como la inhibición de las enzimas del sistema de reparo, como hOGG1, que es responsable por más de 95% de la actividad de la vía de reparo por extirpación de la base, tal

como la extirpación de 8-hidroxideoxiguanosina, que es el principal producto de la actuación de los radicales libres. El óxido nítrico lleva a la inactivación del proceso de apoptosis por la nitrosilación de proteínas pro-apoptóticas, tales como p53, permitiendo de esta forma la sobrevivencia de células con daños en el DNA^[36].

2.3. ACEITES ESENCIALES

También llamada esencia o aceite volátil, que le da un carácter aromático a la planta que lo contiene.

Son constituyentes fitoquímicos con predominio volátil y odorífico, de composición química compleja, se originan a partir de los tejidos secretores, almacenándose en pelos glandulares, cavidades esquizógenas o lisigénas. Generalmente son líquidos fluidos, más livianos que el agua, de olor fuerte y penetrante que recuerda a la planta de origen, incoloras o amarillentas translúcidas, solubles en alcohol, éter, cloroformo e insoluble en agua, dejan manchas sobre el papel que desaparecen con el tiempo^[37-39].

Químicamente son sustancias terpénicas (monoterpenos y sesquiterpenos) y derivados aromáticos fenilproánicos. Pueden ser de tipo alcohol, cetona, fenol, éter, etc^[39].

2.3.1. ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* Y ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES

En numerosos estudios los aceites esenciales han mostrado actividad antibacteriana, anti-*Helicobacter pylori* y actividad antioxidante.

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y *Lippia citriodora* a una concentración de 0.1% (v/v) inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori* a 0.01% entre un pH 4.0 - 5.0^[40].

Ramezani *et al.* (2004)^[41], determinaron la actividad anti-*Helicobacter pylori* del aceite esencial de *Pistacia vera* en 12 tipos de cepas clínicas, resultando la concentración mínima inhibitoria (MIC) a 1.55 mg/mL. Los principales componentes químicos del aceite esencial son α -pineno, β -pineno y α -tuyona.

Bergonzelli *et al.* (2003)^[42], realizó estudios del aceite esencial de 60 especies aromáticas y su actividad anti-***Helicobacter pylori***. De los cuales 30 especies mostraron un rango de inhibición del crecimiento entre 0.7 a 6.3 cm de diámetro, además determinaron que los constituyentes puros de las diferentes especies que mostraron mayor poder anti-***Helicobacter pylori*** son carvacrol, isoeugenol, nerol, citral y sabineno.

Mahaboob *et al.* (2005)^[43], aislaron el eugenol (compuesto fenólico) y cinamaldehído de los aceites esenciales de ***Eugenia caryophyllis*** y ***Cinnamomum verum***, respectivamente. Enfrentaron estos 2 compuestos a 30 cepas clínicas de ***H. pylori***. Los resultados muestran la actividad antibacteriana a 2 µg/mL luego de 9 a 12 horas.

Silva *et al.* (2001)^[44], determinaron el efecto antibacteriano frente a ***H. pylori*** del aceite esencial de ***Dittrichia viscosa subs. viscosa***. A 44.40 µg/mL muestra efecto antibacteriano y entre 88.80-133.20 µg/mL inhibe completamente el crecimiento.

Tzakou *et al.* (2003)^[45], encontró en el aceite esencial de ***Satureja parnassica subs. parnassica*** cariofileno, carvacrol, óxido de cariofileno, espatulenol, p-cimeno y linalol. Concluyendo que estos compuestos, principalmente el carvacrol, son los responsables de la actividad anti-***Helicobacter pylori***.

Güllüce *et al.* (2003)^[46], correlacionan la actividad antibacteriana y antioxidante de la ***Satureja hortensis*** con las estructuras de timol y carvacrol, además del γ-terpineno y p-cimeno. El IC₅₀ es de 23.76± 0.80 µg/mL de la actividad antioxidante, determinado por el método de DPPH.

Lagouri *et al.* (2005)^[47], correlacionan la actividad antioxidante del aceite esencial de ***Satureja thymbra*** a sus constituyentes de grupo fenol, como el carvacrol y timol.

Bezic *et al.* (1999)^[48], afirman que el timol y carvacrol son los marcadores químicos del aceite esencial del género *Satureja*, además de la pulegona, ratificando su presencia en ***Satureja cuneifolia***. Afirmando que estos

compuestos químicos son los responsables de la actividad antibacteriana y antioxidante.

Los aceites esenciales también poseen actividades antioxidante y anticancerígeno. Los terpenos fenólicos, ácido carnosólico, carnosol, rosmarindifenol y rosmarinquinona componentes del aceite esencial de ***Rosmarinus officinalis*** y ***Salvia officinalis*** muestran actividad antioxidante^[49,50].

El timol, componente principal del aceite esencial de ***Thymus vulgaris*** y del ***Thymus serpyllum*** (Lamiaceae), presentan actividad antioxidante, por la estructura insaturada de la función fenol. Lo mismo ocurre con el carvacrol y el eugenol que son de tipo fenólico, componentes mayoritarios del aceite esencial de ***Origanum vulgare*** (Lamiaceae) y en ***Syzygium aromaticum*** (Myrtaceae), respectivamente^[51,52].

Existen monoterpenos antioxidantes de acción anticancerígena como el limoneno y los pinenos, éstos inhiben la producción de colesterol y ayudan en la protección de la actividad de ciertas enzimas^[53].

Zygadlo y col. (1995)^[54], demostraron el efecto antioxidante de los aceites esenciales de ***Thymus vulgaris***, ***Laurus nobilis***, ***Foeniculum vulgare***, ***Eucalyptus globulus***, ***Tagetes minuta***, ***Satureja parvifolia*** y ***Lippia polystachya*** en el aceite de “soja”. Los aceites esenciales de ***T. vulgaris*** y ***L. nobilis*** exhibieron una significativa acción antioxidante seguidos, en orden decreciente, por ***F. vulgare*** y ***E. globulus***. Las esencias de ***T. minuta***, ***S. parvifolia*** y ***L. polystachya*** no mostraron efecto antioxidante y su contribución a la estabilidad oxidativa del aceite de “soja” fue despreciable.

Choi *et al.* (2000)^[55], ensayó la actividad antioxidante de los aceites esenciales de 34 plantas del género Citrus por el método de 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), todas ellas presentaron dicha actividad en un rango de 17.7 a 64%, comparado con el trolox.

Rekka *et al.* (1996)^[56], han investigado el efecto del *chamazuleno*, metabolito activo del aceite esencial de las flores de ***Matricaria***

chamonilla “manzanilla”, y encontraron que inhibió la lipoperoxidación en una manera dependiente del tiempo y la concentración, presentando un IC₅₀ de 18mM después de 45 minutos de incubación.

El eugenol y la vainillina, componentes de aceites esenciales de **Syzygium aromaticum** “clavo de olor”, **Cinnamomum verum** (Lauraceae) “canela” y **Vanilla planifolia** (Orquidaceae) “vainilla”, se usan como antioxidantes naturales y tienen amplia aceptación en la industria de los alimentos^[57].

Ricci *et al.* (2005)^[58], realizó un estudio de la composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial de **Teucrium marum** (Lamiaceae), la que mostró una actividad antioxidante en los ensayos de DPPH, radical superóxido y en la formación del radicales de lipoperoxidación. Ellos hipotéticamente responsabilizan dicha actividad a uno de los 30 componentes que identificaron, la dolichodial (9.38%).

También algunos componentes de aceites esenciales reportan actividad anticancerígeno, ya que el cáncer es una consecuencia del estrés oxidativo. Silvestre *et al.* (2006)^[59], realizó un análisis de los componentes y la actividad anticancerígeno del aceite esencial de **Croton flavens** (Euphorbiaceae), la cual mostró citotoxicidad en líneas celulares de tumor A-549 y DLD-1. Ellos correlacionan que esta actividad, posiblemente, se debe a los componentes llamados α -cadinol, β -elemeno y α -humeleno.

Carhuapoma (2006)^[60], encontró 40 compuestos al 93.6% del aceite esencial de **Luma chequen**, y a su vez determinó la actividad antioxidante en 3 modelos. Los resultados sugieren que la actividad antioxidante se debe al geraniol, α -pineno, linalol, β -pineno, myrceno, limoneno, p-cimeno, terpinen-4-ol y α -terpineol.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló entre los meses de mayo del 2006 a mayo del 2007, en el Laboratorio de Química Orgánica, del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y Laboratorio de Bioquímica de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. La elucidación de los componentes químicos del aceite esencial se realizó en el Laboratorio de Farmacología y Farmacognosia de la Universidad de Barcelona-España.

3.1.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Los principales materiales usados fueron de vidrio y plástico en condiciones asépticas y grado reactivo: beakers, erlenmeyer, matraces aforados, micropipetas, microplacas, placas petri, tubo N° 0.5 de la escala de Mac Farland, jarras de anaerobiosis, etc.

Los principales equipos usados: balanza analítica, equipo de destilación de acero inoxidable, cromatógrafo de gas-detector de ionización de llama (GC-FID) Hewlett-Packard 6890 computarizado con un procesador de software y cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (CG-MS) Hewlett-Packard 5890 series II acoplado a un detector selectivo de masa Hewlett-Packard 5971, con columnas Supelcowax™ 10 y metilsilicona SE-30 (30m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm de grosor de película), centrífuga Gelectric, Baño María Memmert a 37 °C, Baño María hirviente, espectrofotómetro Spectronic 20D+, entre otros.

Los reactivos utilizados más importantes: Dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma, 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) Sigma, ácido tiobarbitúrico Sigma, trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97%) Sigma, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) Sigma, ácido ascórbico, sulfato férrico amónico, acetato de amonio, acetilacetona, fosfato sódico monobásico, fosfato sódico dibásico, etc. Todos los reactivos usados, fueron grado reactivo.

3.1.3. MÉTODOS

El presente trabajo de investigación pertenece a un tipo de estudio analítico, experimental, prospectivo y longitudinal.

3.1.3.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

Las hojas de *Satureja brevicalyx* “urqu muña”, se colectaron tomándose en cuenta sólo aquellas plantas que se encontraban a inicios de su floración, a partir de una población vegetal con crecimiento en laderas naturales de la Comunidad de Tranca (3300 m.s.n.m.), distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, durante el mes de febrero del 2006.

3.1.3.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Las hojas se desecaron bajo sombra a temperatura ambiente (aproximadamente 21 °C), a una presión de 0.72 atmósferas, en los ambientes del Centro de Investigación de Plantas Medicinales Aromáticas y Medicina Tradicional – CIPLAMT, en la ciudad de Huamanga, durante 07 días, hasta obtener una muestra seca que fácilmente se trituró al frotar con la mano volatilizando su aroma, luego fueron conservados en bolsas de papel kraft hasta su utilización.

3.1.3.3. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

A partir de 10 Kg de hojas secas de la muestra fueron sometidos a destilación por el método de arrastre por vapor de agua en un equipo de destilación de acero inoxidable, facilitado por el CIPLAMT. El destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de separación de vidrio, se deshidrató las impurezas de agua en el aceite esencial con Na₂SO₄ anhidro, se filtró, guardándose en un frasco de vidrio color ámbar bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C^[37].

3.1.3.4. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL

La determinación del porcentaje de rendimiento de aceite esencial (%RAE), se realizó a escala laboratorio por el método de arrastre por vapor de agua en un equipo de destilación de vidrio. A partir de 100 g de hojas de *S. brevicalyx*, se obtuvo un determinado volumen que fue medido con una probeta florentino. Por el método gravimetría-volumétrico se determinó el %RAE, aplicando la siguiente fórmula^[37].

$$\%RAE = V_{ol. AE} (mL) / P_{muestra} (g) \times 100$$

Donde:

$V_{ol. AE}$: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

$P_{muestra}$: Peso de la muestra a destilar en gramos.

3.1.3.5. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL

Se determinó las principales constantes físicas por métodos instrumentales: rotación óptica, por polarimetría; densidad, por picnometría; e índice de refracción, por refractometría^[37].

3.1.3.6. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL^[61]

Se realizó por métodos cromatográficos y espectroscópicos. Empleando cromatógrafo de gas-detector de ionización de llama (GC-FID) y el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (CG-MS). Con columnas SupelcowaxTM 10 y metilsilicona SE-30 (30m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm de grosor de película). El análisis por GC-FID fue realizada en un Hewlett-Packard 6890 computarizado con un procesador de software, en condiciones de muestra 0.1 mL de aceite esencial en 10 mL de etanol (1%); con columna a temperatura de inyección 250 °C, temperatura de horno a 60–220 °C (10 minutos), gas transportador helio y temperatura detector a 270 °C. El espectro de masa fue obtenido con un sistema computarizado constituido por un cromatógrafo de gas Hewlett-Packard 5890 series II acoplado a un detector selectivo de masa Hewlett-Packard 5971, usando las mismas condiciones

analíticas mencionadas arriba. El espectro de masa fue tomado sobre 35-400 m/z, usando un voltaje de ionización de 70 eV.

La identificación es basada en comparación de las señales en la mezcla espectral, con estos datos compilados se acudió a una librería referente y con la ayuda de un software *laboratory-made*.

3.1.3.7. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD EN *ARTEMIA SALINA* LEACH POR EL MÉTODO DE ANDERSON, MEYER Y THOMPSON (CYTED, 1995)^[62]

Fundamento: La *Artemia salina* (camarón salino) es un crustáceo cuyas larvas (nauplios) son sensibles a una gran variedad de sustancias, por lo que puede medirse fácilmente la bioactividad de extractos vegetales y servir para dirigir el fraccionamiento bioguiado en forma rápida y simple, es una prueba útil, a pesar de que no es selectiva para ninguna biomolécula. La metodología fue originalmente descrito por Michael *et al.* adaptado por Meyer *et al.* como un bioensayo útil en la investigación química y biológica de productos naturales.

Procedimiento:

Día 1

Se preparó 350 mL de agua de mar (38 g de sal de mar comercial en 1 L de agua destilada), se filtró para oxigenarlo por 1 hora, después de este tiempo se colocó 50 mg de huevos de *A. salina*, ubicándose en un área acondicionado con luz artificial permanente y una bomba de oxígeno con burbujeo lento.

Día 3

Después de 48 horas se transfirieron la mayor cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con agua fresca, se pesó 20 mg de aceite esencial de *S. brevicalyx* solubilizándose en 2 mL de disolvente (0.5 mL DMSO + 1.5 mL de agua de mar). A partir de esta solución, se preparan diluciones de 1000, 100 y 100 ppm, transfiriendo a cada vial 500, 50 y 5 μ L respectivamente. Se empleará 3 viales por cada concentración (09 en total) más 3 viales de control

con 50 µL de DMSO. En cada vial se colocaron 10 nauplios y la dilución del aceite esencial requerida, agregando agua de mar hasta 5 mL por vial, adicionándosele 1 gota de suspensión de levadura como alimento (3 mg de levadura seca se disuelven en 5 mL de agua de mar).

Día 4

Después de 24 horas se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución. Se estimó los valores de la concentración letal media (CL_{50}) mediante un programa de computadoras para el cálculo de los *Probits*.

3.1.3.8. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA POR EL MÉTODO DE DOSIS FIJA (OECD, 2001)^[63,64]

Se determinó la toxicidad aguda del aceite esencial empleando 06 ratones albinos Suizos, por cada grupo de tratamiento, procedentes de la colonia del Laboratorio de Control Biológico del Instituto Nacional de Salud-Chorrillos, con una masa corporal comprendida entre 18 a 22 g los cuales fueron mantenidos a una temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con un ciclo de luz/oscuridad de 12-12h. La alimentación consistió en ratonina peletizada y agua a voluntad. Se confeccionaron grupos de 06 ratones (3 hembras y 3 machos), identificados individualmente para su dosificación exacta mediante un sistema de marcaje con ácido pícrico. Se administró el aceite esencial por vía oral mediante cánula intragástrica, con previa ayuna de 4h; se ensayaron 03 niveles de dosis: 50 mg/kg (mínima), 200 mg/kg (media) y 2000 mg/kg (máxima), con el propósito de determinar la dosis letal media (DL_{50}). Los animales fueron observados constantemente durante las primeras 24h, continuando la misma diariamente durante un período de 14 días, registrándose cualquier síntoma tóxico. Después de los 14 días se sacrificó por tracción de la nuca y se hizo la necropsia, efectuándose un examen macroscópico de órganos y tejidos, principalmente corazón, riñón, bazo, pulmón e hígado. Del hígado y riñón se realizó un examen histopatológico microscópico. El peso corporal se controló al inicio y al final del experimento.

El valor de la DL_{50} se estimó mediante el método estadístico de los *Probits*.

3.1.3.9. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori* DEL ACEITE ESENCIAL

3.1.3.9.1. Aislamiento y activación de la cepa

Helicobacter pylori se aisló por el método de biopsias gástricas, a partir de pacientes del Hospital Nacional Cayetano Heredia, los cuales se sembraron en agar BHI, adicionándole suplemento Skirrow, Isovitalex, Anfoterecin B y sangre de ovino al 5%; luego fueron incubados en una jarra de anaerobiosis con 5% CO₂, 10% O₂ y 85% N₂ a 37 °C durante 7 días. Después de este tiempo se observó el crecimiento de colonias, a las cuales se les hizo las pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa para verificar si corresponde a *H. pylori*, estas colonias fueron sembradas en otra placa que contenía agar BHI, con los mismos requerimientos necesarios para su reproducción y crecimiento, obteniéndose cepas puras que se incubaron a 37 °C por 48 horas en condiciones de microaerofilia. Después de este tiempo, nuevamente se realizó la prueba de ureasa para ver su viabilidad y sembrarlas en Medio EYE que viene a ser agar columbia, yema de huevo al 5%, Isovitalex, anfoterecin B y TTC, incubándose en condiciones de microaerofilia a 37 °C por 48 horas, a partir de este crecimiento se realizaron los ensayos.

3.1.3.9.2. Determinación de la actividad anti-*Helicobacter pilory*, método de Bauer-Kirby^[65]

Fundamento:

Llamada también método de difusión de discos. El crecimiento exponencial de bacterias (*H. pilory*) en el medio de cultivo adecuado es inhibido por las moléculas bioactivas del aceite esencial que difunden del disco de papel de filtro hacia el agar. Este procedimiento se basa en el descrito por Bauer-Kirby y es usado para evaluar la actividad antibacteriana vegetal.

Procedimiento:

Se preparó el medio EYE (agar Columbia y yema de huevo al 15%), adicionándosele suplementos al 1% de IsoVitalex (BBLTM-Becton Dickinson and Co), anfoterecin B y TTC, homogenizándose. A continuación se plaqueó en placas petri (15mm x 15cm), se enfrió y solidificó. Paralelamente se preparó el inóculo de *H. pylori* (TIF 209 Ca) en 10 mL de solución salina al 0.9%, con una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de Mac Farland (1.5×10^8 UFC/mL), se incorporó 500 µL de este inóculo al medio preparado, expandiéndose con sembrador de vidrio por toda la superficie, seguidamente se colocaron discos estériles de papel de filtro (6 mm de diámetro y 0.6 mm de grosor), a los que se embebió 50 µL de dilución en dimetilsulfóxido (DMSO) de las concentraciones de 10, 20, 30 y 50 µg/mL de aceite esencial de *S. brevicalyx*, cada concentración se realizó por triplicado. Todos los procesos antes mencionados se ejecutó en campana de flujo laminar. Las placas invertidas se colocaron en jarras de anaerobiosis con 5% CO₂, 10% O₂ y 85% N₂ (condiciones de microaerofilia) y 30% de humedad, incubándose a 37 °C por 72 horas. Luego de ese tiempo, se realizaron las mediciones de los halos de inhibición. El control negativo fue con DMSO y el control positivo con amoxicilina^[66,67].

3.1.3.9.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Se determinó por el método de dilución en microplacas, para lo cual se empleó una microplaca de 96 pocillos (8 filas x 12 columnas). En 10 tubos de pruebas graduadas se preparó, por separado, suplemento de Isovitalex 10 µL, Anfoterecin B 2 µL, TTC 4 µL y yema de huevo 100 µL, a cada tubo se agregó aceite esencial a las concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 µg/mL, y luego se enrasó a 1 mL con agar Columbia. En otros 2 tubos, se preparó la misma solución, uno para el control negativo (sin aceite esencial, ni cepa) y el otro como control positivo (con cepa). A partir de cada uno de los 12 tubos, respectivamente, se colocaron 200 µL a cada uno de los 12 pocillos de la microplaca, por 4 repeticiones, dejando solidificar. Paralelamente, el inóculo fue preparado en un tubo de prueba con 10 mL de solución salina al 0.9% y se añadieron colonias de *H. pylori* (TIF 209 Ca), hasta alcanzar una turbidez

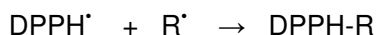
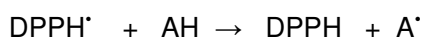
equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de Mac. Farland (aprox. 1.5×10^8 UFC/mL), luego se colocó 5 µL de inóculo sobre la superficie del medio de cada pocillo, posteriormente fueron incubadas en condiciones de microaerofilia con 5% CO₂, 10% O₂ y 85% N₂ a 37 °C por 48 horas; luego de este tiempo se hizo las lecturas correspondientes, corroborando con la prueba de la ureasa, para determinar CMI. Dejando un día más en las mismas condiciones de microaerofilia, a las 72 horas se volvió a realizar la lectura y prueba de ureasa, con la cual se determinó la CMB^[66,67].

3.1.3.10. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.1.3.10.1. MÉTODO DE LA ACTIVIDAD SECUESTRADORA DEL RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL^[68]

Fundamento:

El radical libre y estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), es un indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. Su mecanismo de reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (ej. Compuesto fenólico) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazina y una especie radical (ej. Radical fenoxil). La reacción de ensayo químico *in vitro*, desarrolla un cambio de color violeta a amarillo a medida que disminuye la absorbancia a 515 nm. La reducción del DPPH sigue la siguiente reacción:



Procedimiento:

Se prepararon las siguientes soluciones stock: solución metanólica de DPPH de 20 µg/L; solución metanólica de aceite esencial de 300 µg/L (sol. A); un blanco con metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero; un blanco de muestra con 0,75 mL de muestra (sol. A) y 1,5 mL de metanol; un patrón de referencia (estándar) con 1,5 mL de DPPH y 0,75 mL de agua destilada. La muestra con 0,75 mL de solución A y 1,5 mL de DPPH obteniéndose una concentración final de 100 µg/L, dejando a temperatura

ambiente por 5 minutos y leyendo a 515 nm en un espectrofotómetro. Diluir la solución A con metanol en una proporción de 1:2 (sol. B) para obtener una concentración final de 50 µg/L y luego en una proporción de 1:10 (sol. C) para obtener una concentración final de 10 µg/L. Con las soluciones B y C se procede igual que en el caso anterior. El trolox fue usado como patrón de comparación.

La actividad secuestradora de radicales libres es expresada como una concentración efectiva 50% (CE 50; la concentración de sustancia de prueba requerida para reducir la absorbancia de la solución blanco de DPPH en 50%).

Para calcular la capacidad de secuestro de radicales DPPH[•] (capacidad de decoloración) por el aceite esencial y patrón de referencia, se empleó la siguiente expresión.

$$\% \text{ Capacidad antioxidante} = 1 - (A_2 - A_3) / A_1 \times 100$$

Donde:

A₁ : Absorbancia del patrón de referencia.

A₂ : Absorbancia del compuesto en experimentación.

A₃ : Absorbancia del blanco de la muestra.

3.1.3.10.2. MÉTODO DE LA ACTIVIDAD SECUESTRADORA DEL RADICAL HIDROXILO^[62,69]

Fundamento:

Este método que genera radicales hidroxilos, se basa en la reacción del hierro con el peróxido de hidrógeno, llamada reacción de Fenton:



Dicha reacción está favorecida en presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico, los cuales regeneran el hierro a su estado reducido.

Preparación de la muestra:

Las muestras se prepararon en Buffer fosfato 50 mM, pH 7.4.

Diseño experimental:

La mezcla de incubación consta de EDTA (0.1 mM), complejo Fe³⁺ - EDTA (1:2) (167 µM), DMSO (33 mM), ácido ascórbico (2 mM) y aceite esencial de ***S. brevicalyx*** a 100, 50 y 10 µg/mL se disuelven en metanol y buffer fosfato 50 mM (pH 7.4) hasta un volumen final de 3 mL. La reacción se inicia con la adición del ácido ascórbico. Después de 30 minutos de incubación a 37 °C la reacción se detiene con 1 mL de ácido tricloroacético al 17.5%(p/v). Se detecta el formaldehído producido por el color amarillo, debido al producto formado, llamado 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL), cuya longitud de onda de máxima absorbancia es de 412 nm. El DDL se forma como consecuencia de la reacción de acetato amónico, acetilacetona y formaldehído.

El revelador del formaldehído producido, es una mezcla reactiva de acetato amónico y acetil acetona en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4, a una concentración final de 1M y 0.01 M, respectivamente. El revelado de los distintos ensayos se realizó añadiendo sobre alícuotas de 1,5 mL, 2 mL del revelador, incubando en baño de agua de 58 °C por 5 minutos, luego inmediatamente se sumergió en hielo para detener la reacción. La lectura espectrofotométrica se realizó a 412 nm.

Para la estimación de la actividad captadora de radical hidroxilo de la sustancia problema, los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la producción de formaldehído respecto de la reacción control (ausencia del producto a ensayar).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{C - P}{C} \times 100$$

Donde:

C = Reacción control

P = Reacción con la muestra problema

Los resultados son evaluados estadísticamente mediante un análisis de varianza múltiple utilizando como factores de comparación muestra y concentración, con un nivel de confianza de 95%.

3.1.3.10.3. ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA LIPOPEROXIDACIÓN LIPÍDICA MICROSOMAL^[70]

Se empleó el modelo de la inhibición de la peroxidación lipídica producida por un prooxidante como el peróxido de hidrógeno. Este método indirecto permite detectar los productos de la degradación de los lípidos (aldehídos y

malondialdehído) basado en que 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con 1 molécula de malondialdehído (MDA) para generar un complejo (cromóforo) que se lee a 535 nm. La inhibición se evidencia por una disminución en la producción del complejo MDA-TBA, producto de la peroxidación lipídica.

Muestras

Se utilizó aceite esencial de *S. brevicalyx* a las concentraciones de 10, 50 y 100 µg/mL y como control positivo el trolox a las mismas concentraciones.

Procedimiento:

Reactivos	Blanco	Control	Muestra
Microsoma hepático (2 mg/mL)	0.5	0.5	0.5
Buffer fosfato 100 mM pH 7.4	1.5	1.4	1.3
H ₂ O ₂	-	0.1	0.1
Aceite esencial y trolox	-	-	0.1

Se mezcló e incubó a 37° C por 10 minutos. Se detuvo la reacción con 1,0 mL de ácido tricloracético en cada tubo. Luego llevando a baño maría hirviendo por 10 minutos. Se enfrió y añadió 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico, llevar nuevamente a baño maría hirviendo durante 30 minutos. Se retiró y enfrió en baño de agua helada. Se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 535 nm, a esta longitud se mide el complejo Malondialdehído - cido tiobarbitúrico (MDA – TBA) formado.

Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, mediante la siguiente fórmula:

$$A = \epsilon \times I \times C \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$C = A / I \times \epsilon \quad \dots\dots\dots (2)$$

Donde:

A: Absorbancia

C: concentración

I = 1cm

$\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS^[71]

Los resultados son presentados en tablas y gráficos y sometidas a un Análisis de Varianza y a la Prueba de Tukey para comprobar las diferencias entre las medias, a un 95% de confianza.

IV. RESULTADOS

Las principales constantes físicas del aceite esencial de la ***S. brevicalyx*** (tabla 1), determinadas a una temperatura de 21 °C y a 1 atmósfera de presión, aproximadamente, presentan un buen rendimiento en seco, el aceite es menos denso que el agua e inmiscible, de olor fuerte y persistente, color amarillento y translúcido.

Se elucidó 35 compuestos químicos al 97.1% del total de la muestra de aceite esencial (tabla 2 y figura 1). Como componentes mayoritarios destacan los monoterpenos oxigenados (74.8%), dentro de ellas la pulegona (27.3%), linalol (20.3%), mentona (11.1%), isomentona (8.3%) y *cis*-isopulegona (2.7%); el resto de los componentes de este grupo se hallan en porcentajes por debajo de 1.0 %. Seguidamente predomina el grupo de hidrocarburos sesquiterpénicos (16.0%), entre los cuales están el biciclogermacreno (8.2%), β -cariofileno (6.5%) y bicicloelemeno (0.5%). El grupo de hidrocarburos monoterpénicos (4.1%), contiene como componentes mayoritarios al p-cimeno (2.0%), limoneno (0.7%) y γ -terpineno (0.6%). Los sesquiterpenos oxigenados representan sólo el 1.5%, destacando el espatulenol (0.8%) e isoespatulenol (0.3%). Los compuestos no terpénicos (0.7%) representativos son 3-octanol (0.3%) y 1-octen-3-ol (0.3%).

La citotoxicidad del aceite esencial de ***S. brevicalyx***, presenta una concentración letal media (CL₅₀) de 13.354 µg/mL, analizado estadísticamente por el programa Probit, con un intervalo de confianza al 95% entre 2.517 µg/mL y 70.832 µg/mL (tabla 03).

El ensayo de toxicidad oral de la ***S. brevicalyx*** (tabla 4) reporta una dosis letal media (DL₅₀) de 655.263 mg/kg, estadísticamente fue analizado por el programa Probit, con un intervalo de confianza al 95% entre 256.308 y 1675.209 mg/kg. En la figura 2, se observa el resultado anátomo patológico, con parénquimas hepáticos y renales sin alteraciones significativas. La muerte de una parte de la población de ratones en experimentación, podría deberse a que los órganos más afectados sean los pulmones debido a su mayor exposición a los componentes volátiles del aceite esencial.

El aceite esencial de ***S. brevicalyx*** exhibe actividad anti-***Helicobacter pylori*** (anti-Hp), en comparación con la amoxicilina, antibiótico betalactámico de amplio espectro derivado de la penicilina (amino penicilina). En las cuatro

concentraciones presenta actividad antibacteriana (figuras 3, 4 y 5). A 10 µg/mL de concentración, el aceite esencial tiene un halo de inhibición de 11mm de diámetro, frente a 33mm de la amoxicilina; esto representa, para el aceite, un tercio de la actividad del antibiótico más usado en los esquemas de tratamientos infecciosos producidas por esta bacteria.

Presenta una relación directa las concentraciones y la actividad antibacteriana. A medida que se incrementa la concentración, muestra mayor actividad anti-HP. A 10 µg/mL el porcentaje es de 33.33% y a 50 µg/mL es de 45.45% (figura 5).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), se observa que es 1.00 µg/mL y 2.00 µg/mL, respectivamente, frente a 0.02 µg/mL de la amoxicilina (tabla 5).

En la figura 6 se observa el color rojo característico en algunas microplacas, que indica crecimiento de *H. pylori*, mientras que en las que no crece presenta un color amarillento claro. En la parte inferior de las microplacas se presenta las pruebas de ureasa, para corroborar la presencia de *H. pylori*. A partir de la tercera columna la presencia de *H. pylori* es negativo, confirmando su acción bactericida del aceite esencial.

El aceite esencial de *S. brevicalyx* presenta actividad antioxidante, según el modelo del radical DPPH (1,1-diphenyl -2-picryl hydrazyl) comparado con el trolox. En la figura 7, realizando el análisis de varianza (ANVA), existen diferencias entre las tres concentraciones de aceite esencial por su efecto de captación del radical DPPH. La prueba de Tukey determina que la concentración de 100 µg/mL tiene mayor efecto de captación radicalaria, seguida de las concentraciones de 50 µg/mL y 10 µg/mL, por ello que se correlacionan en el orden de (a), (b) y (c).

En la figura 8, se realiza un tratamiento comparativo por la prueba de Tukey, entre el aceite esencial de *S. brevicalyx* y el trolox de tres concentraciones: 10, 50 y 100 µg/mL. Observándose que existen diferencias en sus capacidades de captación del radical DPPH, el trolox posee mayor capacidad anti-radicalaria en las tres concentraciones frente al aceite esencial de *S. brevicalyx*. Sin embargo, a medida que incrementa la concentración también potencia su actividad antioxidante para ambos compuestos.

En la figura 9, de acuerdo al análisis de regresión por correlación, entre la concentración y el efecto de captación del radical DPPH, se corrobora que a

mayor concentración mayor es el efecto antioxidante del aceite esencial de ***S. brevicalyx*** y la relación de esta magnitud es de 0.997, lo que quiere decir que la variación del efecto de captación está explicada en un 99.97% por la variación de la concentración, siendo un valor elevado (según la teoría el valor de R^2 va desde 0 a 1), por lo que 0.997 es muy cercano a 1.

En las figuras 10 y 11, se presentan las concentraciones de inhibición media (IC_{50}) para ambos compuestos. El aceite esencial de ***S. brevicalyx*** presenta 28.84 $\mu\text{g/mL}$, y el trolox 16.75 $\mu\text{g/mL}$, estos valores confirman el efecto antioxidante de la ***S. brevicalyx*** cercano al del trolox.

En la figura 12, se estima la actividad captadora del radical hidroxilo, expresado como porcentaje de inhibición de la producción de formaldehído respecto de la reacción del control, presentando diferencias en los porcentajes de inhibición. Según el análisis de varianza, estadísticamente hay diferencias en su capacidad de captación del radical hidroxilo en las tres concentraciones. El de las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, están por encima del 50% de inhibición de la producción de formaldehído. Mientras que el de 10 $\mu\text{g/mL}$ se encuentra por debajo del 50%. La prueba de Tukey determina que la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ tiene mayor efecto de inhibición, seguida de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$.

En la figura 13, se hace el análisis de regresión por correlación, entre la concentración y el efecto de inhibición, dicha recta indica que a mayor concentración mayor es el efecto de inhibición. La magnitud de la relación de ambas variables, concentración e inhibición, es de 0.99, lo que quiere decir que la variación del efecto de inhibición está explicada en un 99.99% por la variación de la concentración, este resulta es un valor elevado.

Este modelo, también, confirma que cuanto mayor es la concentración del aceite esencial, mayor es su capacidad antioxidante del aceite esencial de ***S. brevicalyx***.

En la figura 14, se compara los efectos antioxidantes de 3 concentraciones de aceite esencial y trolox a 100, 50 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Estadísticamente hay diferencias en la capacidad de inhibición del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) frente al trolox, este último exhibe mayor capacidad de inhibición en cada concentración.

En la figura 15, la inhibición del complejo MDA-TBA, resulta que hay diferencias de inhibición entre el aceite esencial y el control negativo que no posee ningún agente antioxidante, este último se dispara en la concentración del complejo

MDA-TBA llegando hasta 53.9×10^{-8} moles \times cm. Según el ANVA existe diferencias entre las tres concentraciones por su efecto en la concentración de del complejo MDA-TBA, la prueba de Tukey determina que la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ presenta menor concentración de MDA-TBA, seguida de 50 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

En la figura 16, se observa la tendencia de la concentración del complejo MDA-TBA, entre la concentración y el efecto de inhibición, dicha recta indica que a mayor concentración de aceite esencial de ***S brevicalyx*** existe una menor concentración de MDA-TBA. La magnitud de la relación de ambas variables, concentración e inhibición, es de 0.8235, lo que quiere decir que la variación del efecto de inhibición está explicada en un 82.35%.

En este modelo, que emplea microsoma hepático de rata, el aceite esencial estaría protegiendo de la peroxidación lipídica, por ello se observa la disminución de concentración del complejo MDA-TBA en los tratamientos que tienen agente antioxidante.

Tabla 1. Principales constantes físicas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*.

CONSTANTES FÍSICAS	VALORES
Rendimiento en seco	1.80 %v/p
Rotación óptica (21°C)	-2 a +4°
Densidad (21°C)	0.9047 g/mL
Índice de refracción (21°C)	1.475

Tabla 2. Composición química del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*.

CONSTITUYENTES	%	IR1	IR2	IR3	IR4
α -pineno	0.3	1035	-	938	217
β -pineno	0.2	1123	148	978	238
Sabineno	0.2	1133	156	972	235
β -mirceno	0.1	1169	182	-	-
Limoneno	0.7	1211	209	1027	263
1,8-cineol	0.6	1222	215	1027	263
γ -terpineno	0.6	1258	234	1054	275
p-cimeno	2.0	1285	248	1017	258
amil isovalerato	0.1	-	-	1094	294
3-octanol	0.3	1388	298	983	242
1-octen-3-ol	0.3	1469	340	966	232
Mentona	11.1	1480	347	1142	320
Bicicloelemeno	0.5	1487	351	1499	493
Isomentona	8.3	1506	360	1151	326
Linalol	20.3	1545	377	1090	293
<i>Trans</i> -isopulegona	0.9	1590	396	1158	329
<i>cis</i> -isopulegona	2.7	1602	400	1157	329
β -cariofileno	6.5	1622	410	1428	464
Pulegona	27.2	1676	439	1226	365
α -humuleno	0.3	1689	447	1460	478

CONSTITUYENTES	%	IR1	IR2	IR3	IR4
α -terpineol	0.5	1701	454	1178	341
Piperitona	0.2	1728	467	1234	368
Biciclogermacreno	8.2	1762	479	1500	497
Acetato de geranil	0.2	1773	484	1359	428
Acetato de timil	0.8	1863	527	1339	417
Acetato de carvacril	0.4	1886	539	1346	421
Piperitenona	0.4	1956	571	1316	406
Oxido de cariofileno	0.3	2021	600	1582	540
<i>E</i> -nerolidol	0.1	2072	625	1549	522
Espatulenol	0.8	2149	662	1575	536
Carvacrol	0.6	2190	680	1278	388
Timol	0.6	2224	700	1267	383
Isoespatulenol	0.3	2248	706	1603	563
Aromadendreno	0.2	-	-	1467	481
Germacreno B	0.3	-	-	1480	488
IDENTIFICACIÓN TOTAL	97.1				

Leyenda:

- IR1 : Índice de retención en Supelcowax Kovats
IR2 : Índice de retención en Supelcowax metil ester
IR3 : Índice de retención en metilsilicona Kovats
IR4 : Índice de retención en metilsilicona metil ester



HM : Hidrocarburo monoterpénico **MO** : Monoterpeno oxigenado
HS : Hidrocarburo sesquiterpénico **SO** : Sesquiterpeno Oxigenado
OTROS: Otros grupos **NID** : No identificados

Figura 1. Grupos de constituyentes fitoquímicos elucidados del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*.

Tabla 3. Citotoxicidad del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* según método de *Artemia salina* Leach.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL ₅₀ (µg/mL)
1000	
100	13.3534
10	

Tabla 4. Toxicidad oral del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* en ratones albinos.

CONCENTRACIÓN (mg/kg)	SÍNTOMAS	DOSIS LETAL MEDIA DL ₅₀ (mg/kg)
2000	Depresión profunda, incoordinación motora, respiración acelerada,	
200	piloerección, arrastra el tren	655.2632
50	posterior, sedación, reestablecimiento y muerte de un número parcial.	

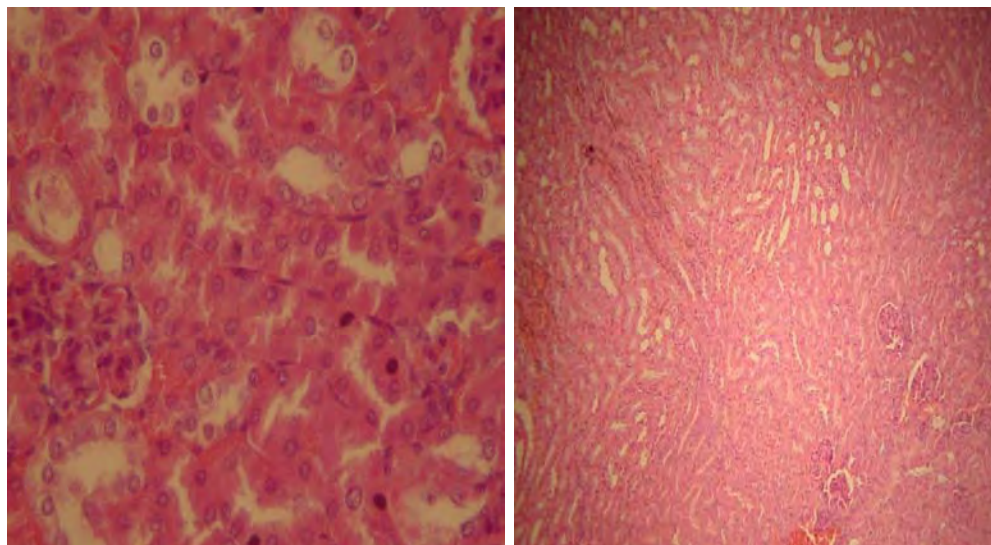


Figura 2. Parénquimas hepático y renal de ratones albinos sin alteraciones significativas del efecto de toxicidad del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*.

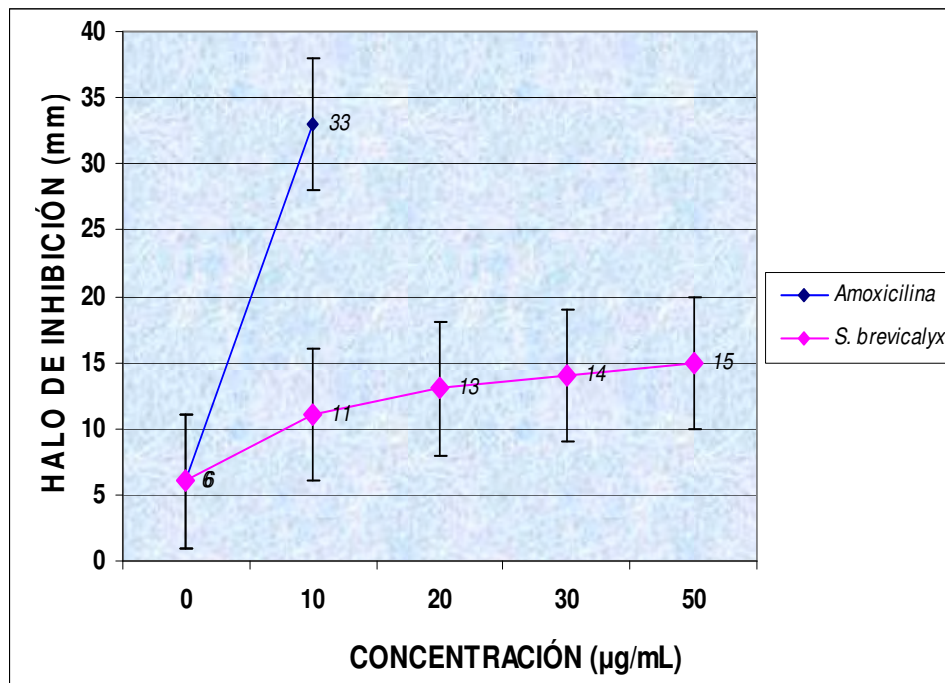
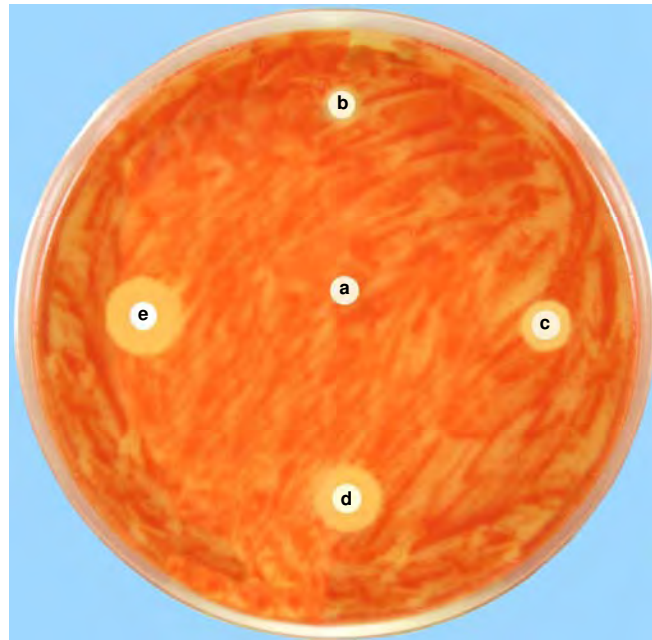


Figura 3. Actividad anti-*Helicobacter pylori* del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* en comparación con la amoxicilina.



a: 0; b: 10; c: 20; d: 30; e: 50 µg/mL

Figura 4. Actividad anti-*Helicobacter pylori* del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* según el método Difusión de Discos.

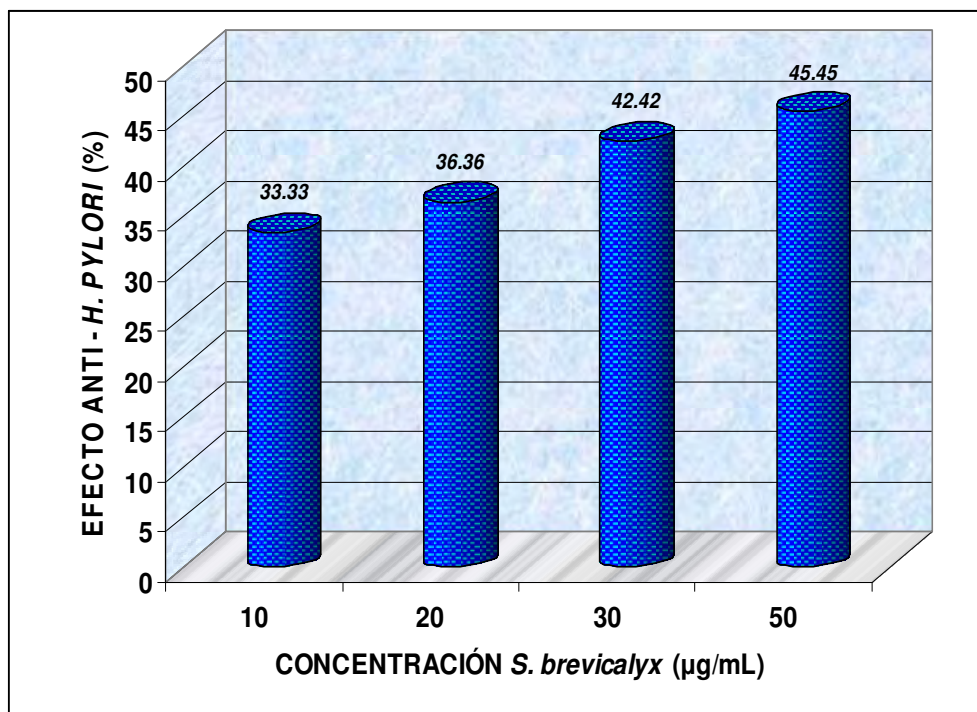


Figura 5. Porcentaje de actividad anti-*Helicobacter pylori* del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* usando como estándar la amoxicilina.

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* en comparación con la amoxicilina.

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA
<i>S. brevicalyx</i>	1.00 µg/mL	2.00 µg/mL
Amoxicilina	0.02 µg/mL	-----



Concentraciones: 0.5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9µg/mL

(-) : control sin cepa

(+) : Control con cepa

Figura 6. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* según método de Dilución en Microplacas.

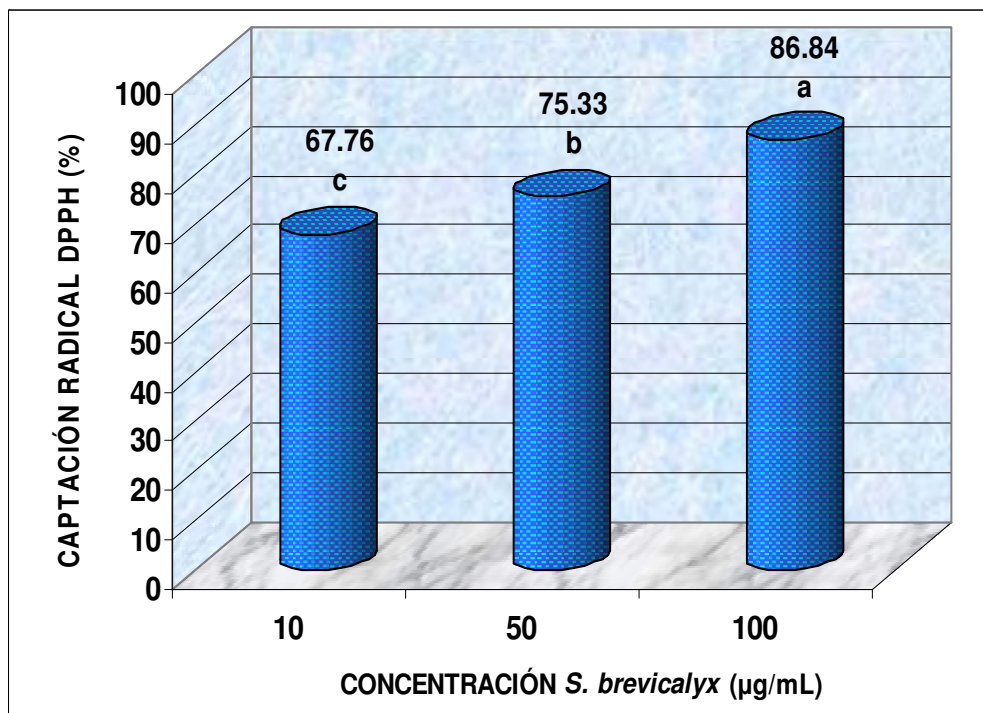
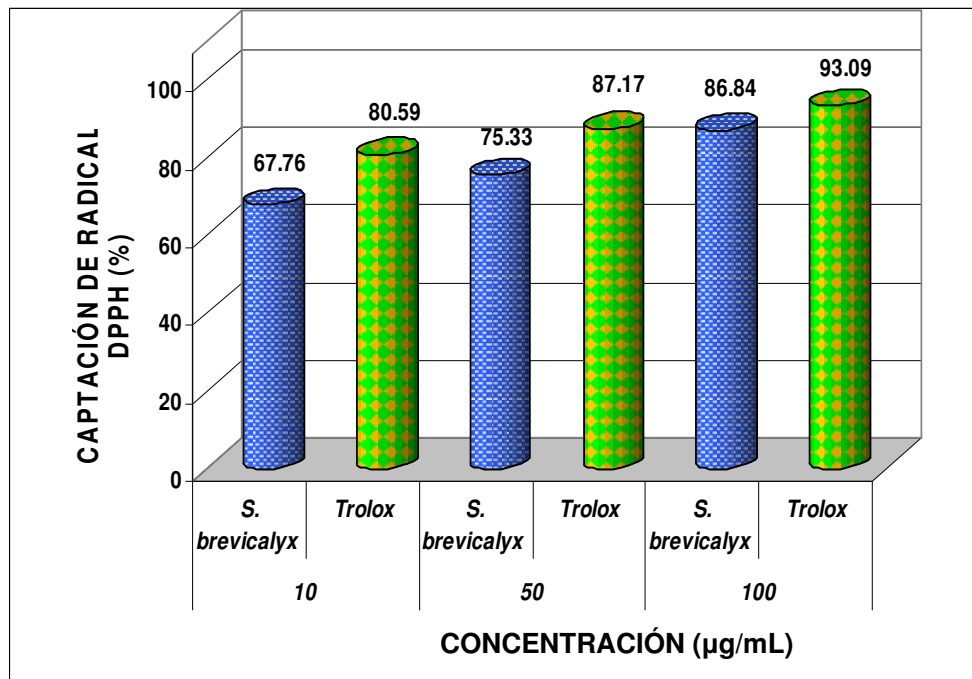


Figura 7. Valores promedios y prueba de Tukey para la captación de radical DPPH de tres concentraciones del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*.



10µg/mL

tc = 31.804; gl = 4; P = 0.00; SIGNIFICATIVO

50µg/mL

tc = 34.469; gl = 4; P = 0.00; SIGNIFICATIVO

100µg/mL

tc = 29; gl = 4; P = 0.00; SIGNIFICATIVO

Figura 8. Valores promedios y prueba Tukey para la captación de radical DPPH de tres concentraciones del aceite esencial de ***S. brevicalyx*** en comparación con el Trolox.

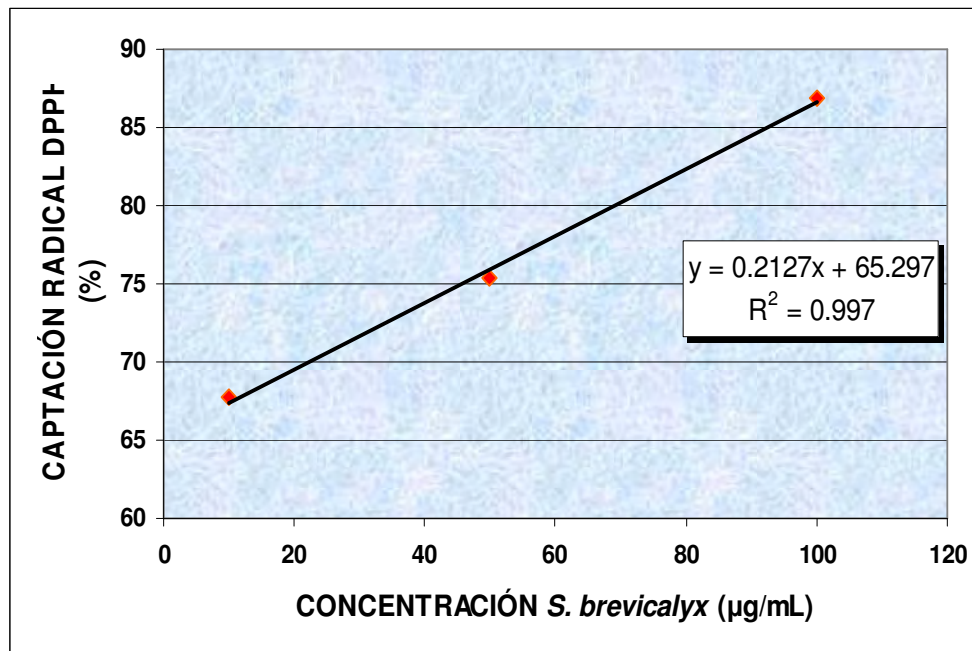


Figura 9. Tendencia de la captación del radical DPPH de tres concentraciones del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*.

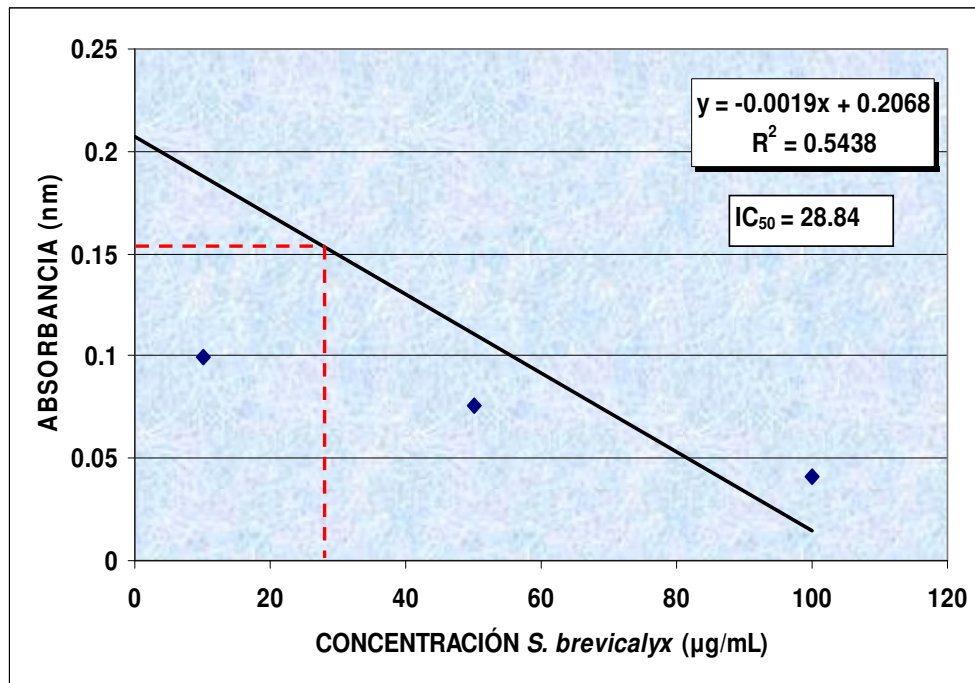


Figura 10. Concentración de inhibición media del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* frente al DPPH.

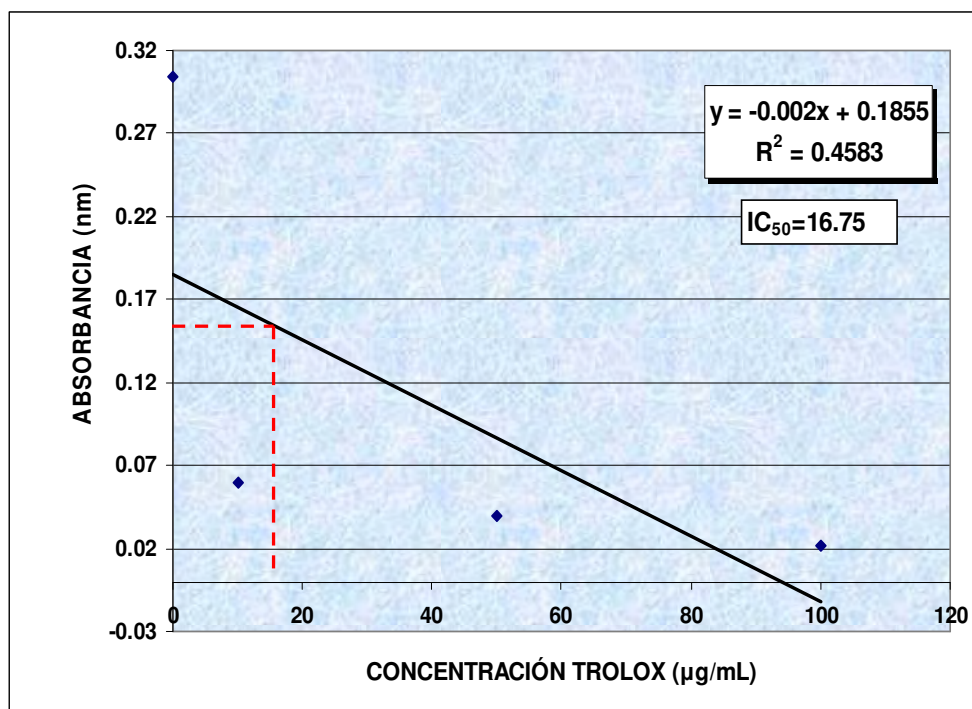


Figura 11. Concentración de inhibición media del Trolox frente al DPPH.

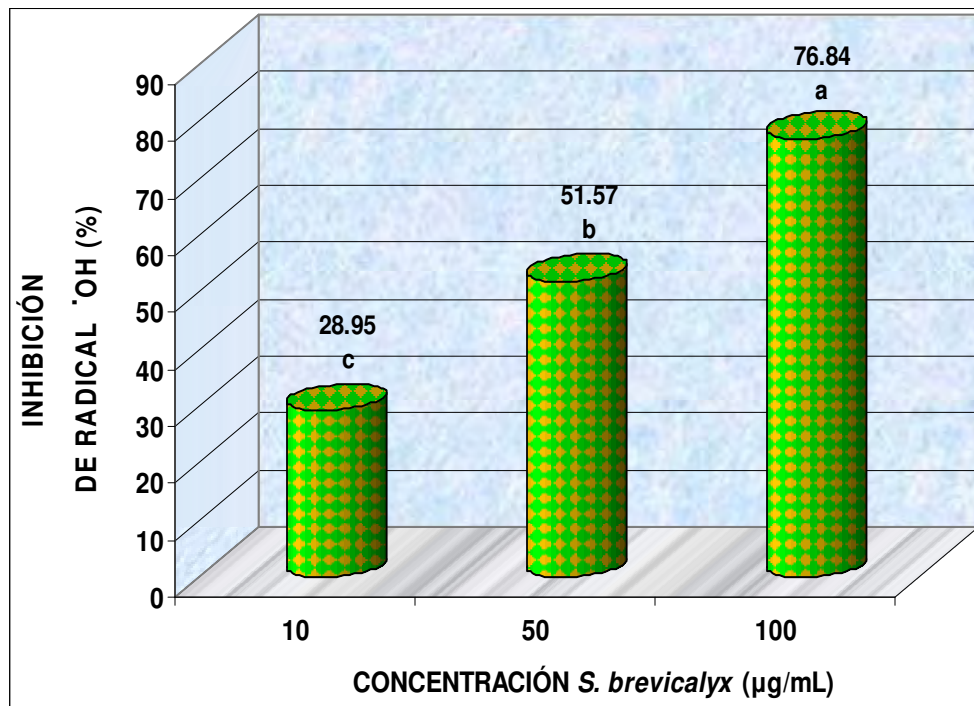


Figura 12. Valores promedios y prueba de Tukey para la inhibición de radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) de tres concentraciones del aceite esencial de *S. brevicalyx*.

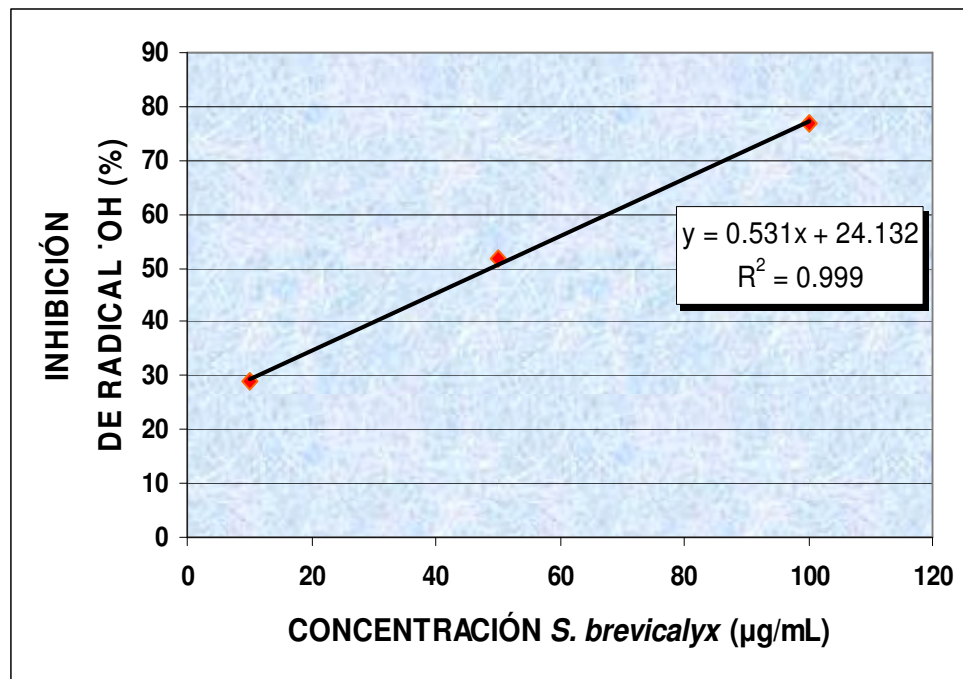
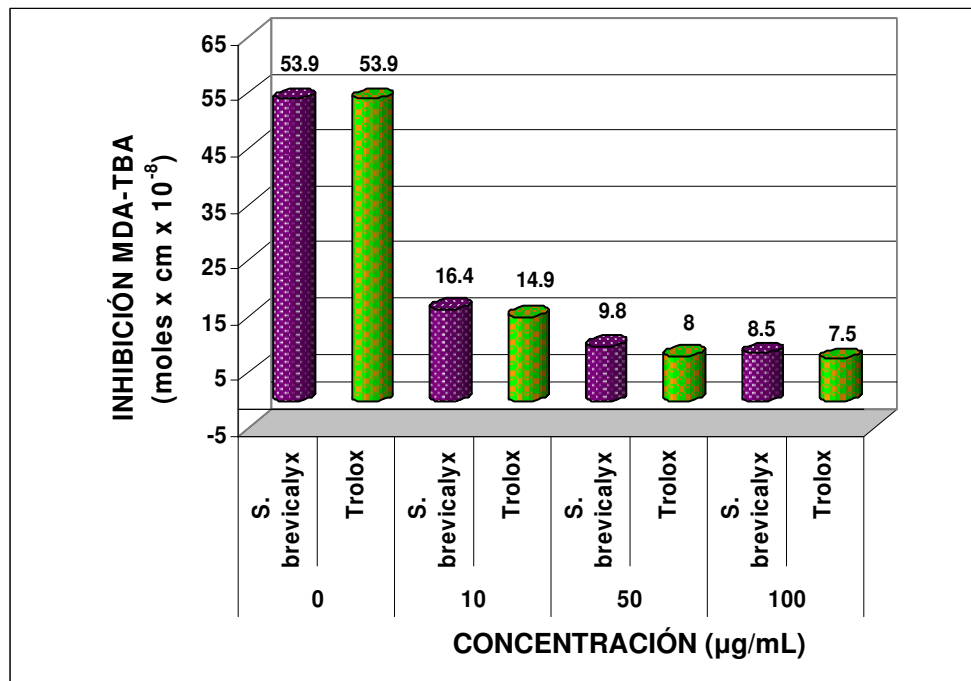


Figura 13. Tendencia para la inhibición de radical hidroxilo (\cdot OH) de tres concentraciones del aceite esencial de *S. brevicalyx*.



10µg/mL tc = 7.73; gl = 4; P = 0.002; SIGNIFICATIVO
 50µg/mL tc = 11.75; gl = 4; P = 0.00; SIGNIFICATIVO
 100µg/mL_ tc = 5.976; gl = 4; P = 0.004; SIGNIFICATIVO

Figura 14. Inhibición del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico por el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* y trolox.

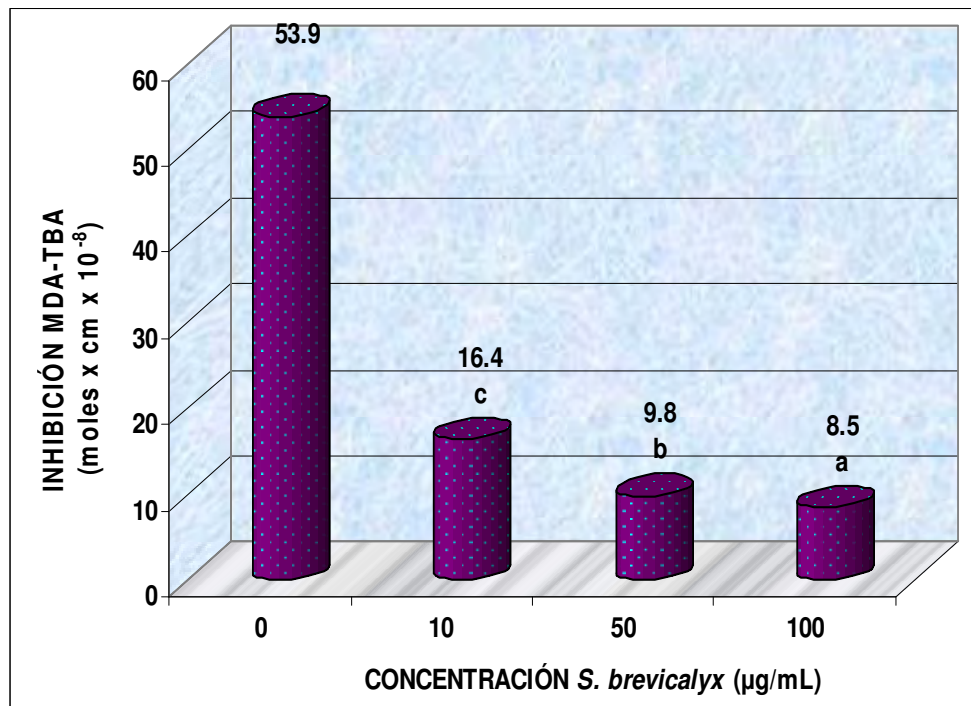


Figura 15. Valores promedios y prueba de Tukey de la inhibición del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* frente al control negativo.

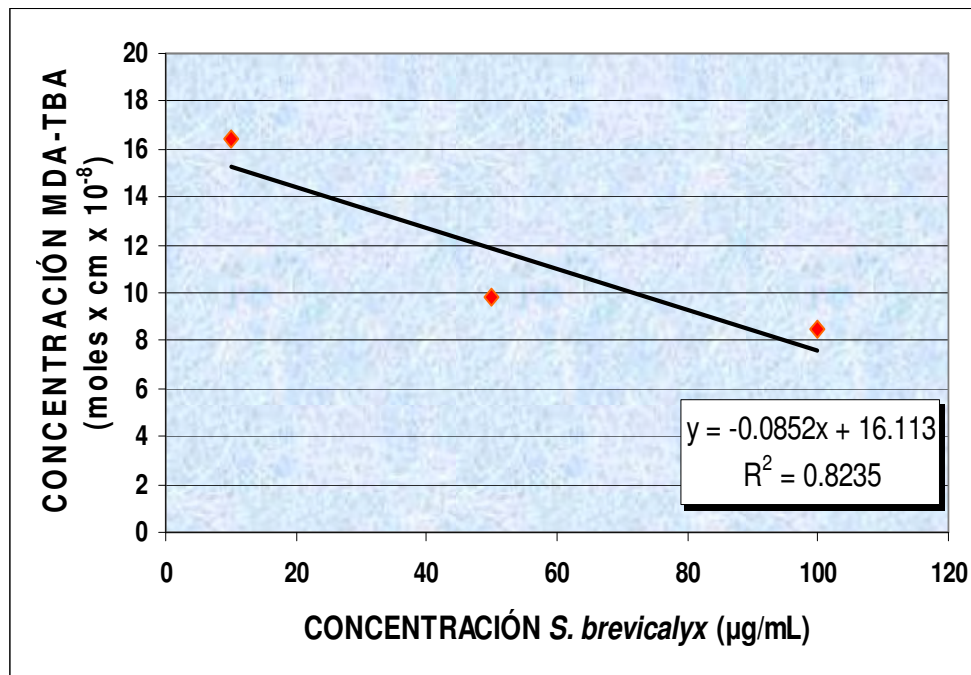


Figura 16. Tendencia de la concentración del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico a tres concentraciones del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*.

V. DISCUSIÓN

Las constantes físicas del aceite esencial de ***S. brevicalyx*** caracterizan los grupos de componentes químicos presentes, y además son parámetros de calidad aromática que permiten tomar decisiones en futuros proyectos de rentabilidad comercial. Según Bandoni (2000)^[37], los valores de rendimiento $\geq 1.0\%$ de aceite esencial, las categorizan a las especies aromáticas en excepcionalmente interesantes y promisorias. Para el caso de la ***S. brevicalyx*** resulta ser un valor significativamente alto (tabla 1), llegando a 1.80% v/p. Los resultados de la rotación óptica, densidad e índice de refracción, permitirán en lo posterior caracterizar y analizar los parámetros de control de calidad, siendo novedosos para el caso de la especie en estudio.

El aceite esencial de ***S. brevicalyx*** al contener unos 35 componentes químicos, estaría dotándole de una alta bioactividad farmacológica al extracto vegetal en conjunto, actuando en sinergismo, ya que el uso frecuente se da en base al extracto de las hojas. Cabe destacar, que el carvacrol (0.6%) y timol (0.6%) son los marcadores químicos del género *Satureja*, además de la pulegona, y que corresponden a monoterpenos oxigenados^[72].

La pulegona posee grupo funcional cetónico, es un potente antiséptico y biocida, favorece el parto y la expulsión de la placenta^[73]. El linalol, posee grupo funcional alcohol, es un antimicrobiano moderado, estomacal y carminativo^[74]; además, es muy empleada en las industrias farmacéutica y perfumero cosmética^[75]. La mentona, posee grupo funcional cetónico, se le relaciona con las propiedades antiespasmódica, carminativa y estomacal^[74]. El resto de los metabolitos elucidados, estarían actuando en sinergismo con los componentes mayoritarios, éstos reforzarían la actividad biológica del aceite esencial de ***S. brevicalyx***; amerita hacer hincapié, que el timol y carvacrol, son los metabolitos más potentes desde el punto de vista antimicrobiano y antioxidante que se han estudiado hasta el momento con respecto a los aceites esenciales, y son de tipo fenólico^[46,48,74].

Al realizar un estudio de los metabolitos bioactivos de una planta, debe identificarse preliminarmente el grado de actividad biológica, para ello el método de ***Artemia salina*** es un método de bioensayo versátil y estandarizado que permite monitorear la presencia de compuestos citotóxicos y antitumorales de utilidad potencial^[62]. Moreno y col. (2006)^[76] y Eugenia y col. (2007)^[77]

ensayaron en nauplios de **A. salina** la citotoxicidad del aceite esencial de **Simsia pubescens** y **Croton malambo**, determinando su CL_{50} , respectivamente para ambos, en 0.12 $\mu\text{g/mL}$ y 15.32 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores comparados con el de 13.45 $\mu\text{g/mL}$ para el sulfato de vinblastina, confirman que los aceites de **S. pubescens** y **S. brevicalyx** ($CL_{50} = 13.354 \mu\text{g/mL}$), son posibles agentes citotóxicos y antitumorales. Un aceite esencial o uno de sus metabolitos, es considerado potencialmente útil como citotóxico y antitumoral cuando su CL_{50} es $\leq 30 \mu\text{g/mL}$ ^[76]. Por lo tanto, para el aceite esencial de la **S. brevicalyx** resulta interesante continuar sus estudios de citotoxicidad y otras actividades biológicas, y éstas se justifican por la diversidad de metabolitos caracterizados que suman un total de 35 compuestos. El sulfato de vinblastina, utilizado como punto de comparación, es un derivado semisintético de la vinblastina, el cual se obtiene de la planta de **Catharanthus roseus**, la cual es usada en el tratamiento de leucemia infantil y en la quimioterapia de diversos cánceres. La vinblastina previene la producción de microtubulos, los cuales son vitales en la separación física de células durante la división celular. Sin microtubulos la división celular no puede ocurrir, por tanto la célula muere; además interfiere con la capacidad de la célula para sintetizar ADN y ARN^[76].

De acuerdo a la dosis letal media de la **S. brevicalyx** ($DL_{50} = 655.263 \text{ mg/kg}$), se categoriza como ligeramente tóxica, extrapoladas en la tabla de Williams^[76]. Suarez *et al.* (2003)^[78], determinaron para la **Satureja viminea** una DL_{50} de 556.80 mg/kg, ambas especies corresponden al género Satureja, por ello que los valores son muy próximos. Existen muchas evidencias sobre la toxicidad de la pulegona, que es el principal componente del género Satureja^[46,48,78]. Nassiff y col. (2004)^[73], señalan que la pulegona por encima de 0.065g/250mL es muy tóxica en mujeres embarazadas, ocasionando el aborto. La pulegona pueda permitir la formación de epóxido de pulegona, este grupo químico es muy inestable, tiene mucha tensión angular y puede abrirse con facilidad frente a proteínas y ácidos nucleicos del organismo humano, con la posibilidad de generar mutaciones^[80]. Razón por la cual, el Comité de Expertos de la Organización Internacional *Flavour Industry*, recomiendan que la presencia de pulegona en productos alimenticios acabados, se limita a un máximo de 250 ppm en golosinas y de 20 ppm en comidas y bebidas^[79].

Carhuapoma (2006)^[60], determinó la DL_{50} para el aceite esencial de **Luma chequen**, resultando 906.114 mg/kg, este valor confirma una toxicidad menor que del aceite esencial de **S. brevicalyx**; esta diferencia, podría deberse que los componentes del aceite de este último sean mucho más bioactivos por la variedad de componentes químicos que presenta, como la pulegona, linalol, mentona, isomentona, timol, carvacrol, entre otras.

El aceite esencial inhibe el crecimiento del **H. pylori** a una concentración de 1.00 µg/mL, mientras que la amoxicilina lo hace en 0.02 µg/mL; esto expresa que el antibiótico es 50 veces más potente que el aceite. Sin embargo, comparando dicha actividad con la ampicilina, antibiótico betalactámico que pertenece a la familia de la amoxicilina, el aceite esencial muestra relativamente mayor actividad. Li *et al.* (2005)^[66, 81], determinaron la CMI de la ampicilina en 2.00 µg/mL.

La CMB resultante para el **H. pylori** es de 2.00 µg/mL; es decir, que dicha concentración posee efecto bactericida, según el modelo ensayado.

El efecto bacteriostático y bactericida de los aceites esenciales se debe a sus componentes fitoquímicos, como los de grupo fenol, alcohol y cetónico^[42, 45, 74]. El aceite esencial de **S. brevicalyx**, presenta principalmente compuestos como el timol, carvacrol, linalol, α -terpineol, pulegona, mentona, isomentona, *cis*-isopulegona y *trans*-isopulegona; y estos compuestos son de tipo fenol, alcohol y cetónico.

Ramezani *et al.* (2004)^[41], determinó la CMI para **H. pylori** del aceite esencial de **Pistacia vera** en 1.55 mg/mL, correlacionan dicha actividad con el α -pineno, β -pineno y α -tuyona. La actividad del aceite de **S. brevicalyx**, es superior que el aceite de **P. vera**, y también contiene α -pineno y β -pineno.

Mahaboob *et al.* (2005)^[43], determinaron la actividad anti-**Helicobacter pylori** (anti-HP) en 2.00 µg/mL para el eugenol y cinamaldehído, componentes de los aceites esenciales de **Eugenia caryophyllis** y **Cinnamomum verum**. El aceite de **S. brevicalyx**, posee una actividad similar, estos resultados muy cercanos se deben a que el eugenol es un compuesto fenólico, como el timol y carvacrol; metabolitos bactericidas de primer orden.

Bergonzelli *et al.* (2003)^[42], demostraron la actividad anti-Hp de los aceites esenciales de 30 especies, mostrando un rango de inhibición del crecimiento entre 0.7 - 6.3 cm de diámetro; atribuyendo que los constituyentes puros responsables son: carvacrol, isoeugenol, nerol, citral y sabineno. El aceite volátil de ***S. brevicalyx*** posee como parte de sus componentes el carvacrol.

Tzakou *et al.* (2003)^[45], encontró en el aceite esencial de ***Satureja parnassica subs. parnassica*** cariofileno, carvacrol, óxido de cariofileno, espatulenol, p-cimeno y linalol. Concluyendo que estos compuestos, principalmente el carvacrol, son los responsables de la actividad anti-***Helicobacter pylori***.

Silva *et al.* (2001)^[44], determinaron el efecto antibacteriano frente a ***H. pylori*** del aceite esencial de ***Dittrichia viscosa subs. viscosa***. La CMI es 44.40 µg/mL y la CMB es entre 88.80-133.20 µg/mL. Los valores del aceite de la ***S. brevicalyx*** son muy superiores frente a este resultado.

Con mayor certeza, se puede afirmar que los responsables primarios de la actividad anti-***Helicobacter pylori*** del aceite esencial de ***S. brevicalyx***, son: timol, carvacrol, linalol, α-terpineol, pulegona, mentona, isomentona, *cis*-isopulegona y *trans*-isopulegona.

El aceite esencial de ***S. brevicalyx***, posee actividad antioxidante, y que está en función de sus componentes químicos y sus estructuras. Choi *et al.* (2000)^[55], determinaron la actividad antioxidante para el geraniol en un 87.7% de capacidad de captación del radical DPPH, seguido por terpinoleno en 87.4% y γ-terpineno en 84.7%, usando como patrón de comparación al trolox. El aceite esencial de ***S. brevicalyx*** posee γ-terpineno, que posiblemente sea uno de los componentes fitoquímicos que esté dotándole de actividad antioxidante.

Güllüce *et al.* (2003)^[46], correlacionan la actividad antibacteriana y antioxidante de la ***Satureja hortensis*** con las estructuras de timol y carvacrol, además del γ-terpineno y p-cimeno. El IC₅₀ de su acción antioxidante es de 23.76± 0.80 µg/mL, determinado por el método de DPPH. El aceite esencial de ***S. brevicalyx*** contiene timol y carvacrol.

El aceite esencial de ***S. brevicalyx***, en los tres modelos ensayados, muestra capacidad antioxidante comparado con el trolox, dicha actividad se debe a las estructuras moleculares de sus constituyentes químicos, siendo 35 (tabla 2).

Choi *et al.* (2000)^[55], reportan que el linalol y el α -pineno tienen capacidad de captación del radical DPPH entre 18.7 - 22.4%, y estas dos moléculas están presentes en el aceite esencial de ***S. brevicalyx***, el primero representa (20.3%) y el α -pineno (0.3%). Pero además el α -terpineol, β -mirceno, β -pineno, limoneno y p-cimeno, también están presentes en el aceite esencial ensayado mostrando una actividad anti-radicalaria frente al DPPH entre 8.8 – 16.5% de captación.

Ruberto *et al.* (2000)^[50], ensayaron 100 compuestos puros de aceites esenciales en dos modelos de actividad antioxidante, usando como referente al α -tocoferol. Los compuestos puros que muestran acción antioxidante, también presentes en el aceite esencial de ***S. brevicalyx***, son: pulegona, 1.8-cineol, α -pineno, β -pineno, α -terpineol y β -mirceno; que muestran una actividad antioxidante entre 3.2 - 34.9%, en orden ascendente.

Sylvestre *et al.* (2006)^[59], analizaron el aceite esencial y su actividad anticancerígeno del ***Croton flavens***, mostrando citotoxicidad en líneas celulares de tumor A-549 (de pulmón) y DLD-1 (de colon). Ellos correlacionan que esta actividad, posiblemente, se debe a los componentes llamados α -cadinol (3.97%), β -elemeno (1.53%) y α -humeleno (1.06%). Se puede observar que el aceite esencial de ***S. brevicalyx*** tiene α -humeleno (0.3%), además los radicales libres constituyen uno de los factores condicionantes de la carcinogenesis, posiblemente esta molécula sea un potencial anticancerígeno del aceite esencial de “urqu muña”.

Lagouri *et al.* (2005)^[47], correlaciona la actividad antioxidante del aceite esencial de ***Satureja thymbra*** a sus constituyentes de grupo fenol, como el carvacrol y timol.

Bezic *et al.* (1999)^[48], afirma que el timol y carvacrol son los marcadores químicos del aceite esencial del género *Satureja*, ratificando su presencia en ***Satureja cuneifolia***. Afirmando que estos compuestos químicos son los responsables de la actividad antibacteriana y antioxidante.

Dicho estudio justifica y valida la actividad anti-***Helicobacter pylori*** y antioxidante del aceite esencial de ***S. brevicalyx***. En los modelos ensayados de

actividad biológica, todas las moléculas del aceite esencial actúan en sinergismo, potenciando su capacidad antibacteriana y antioxidante, dicha actividad se debe a los 35 componentes, destacando los principales componentes con mayor actividad.

El Perú es poseedora de muchas especies aromáticas nativas y endémicas, deben continuarse las investigaciones que validen su uso popular, como el caso de la ***S. brevicalyx*** “urqu muña” u “orégano de los incas”.

VI. CONCLUSIONES

1. Se elucidó 35 compuestos del aceite esencial de ***Satureja brevicalyx***, siendo los mayoritarios 74.8% de monoterpenos oxigenados (pulegona 27.2%, linalol 20.3%, mentona 11.1%, isomentona 8.3%, *cis*-isopulegona 2.7%, *trans*-isopulegona 0.9%, carvacrol 0.6%, timol 0.6% y α -terpineol 0.5%); 16% de hidrocarburos sesquiterpénicos (biclogermacreno 8.2%, β -cariofileno 6.5% y bicicloelemeno 0.5%); 4.1% de hidrocarburos monoterpénicos (p-cimeno 2.0%, limoneno 0.7% y γ -terpineno 0.6%); y 1.5% de sesquiterpenos oxigenados (espatulenol 0.8% e isoespatulenol 0.3%).
2. Se determinó que la citotoxicidad del aceite esencial confirma su alta bioactividad, siendo su concentración letal media (CL₅₀) de 13.35 μ g/mL; y su dosis letal media (DL₅₀) de 655.26 mg/kg, considerándose ligeramente tóxica.
3. Se determinó que el aceite esencial de ***Satureja brevicalyx*** posee un efecto anti-***Helicobacter pylori***, con una concentración mínima inhibitoria de 1.00 μ g/mL y con una concentración mínima bactericida de 2.00 μ g/mL.
4. Se determinó que el aceite esencial de ***Satureja brevicalyx*** muestra un significativo efecto antioxidante, comparado con el trolox.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Cronquist A.** An integrated system of classification of flowering plants. Edit. Columbia University Press. New York; 1981.
2. **Brako L, Zarucchi J.** Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Perú. Missouri Botanical Garden. Missouri; 1993.
3. **Chumacero A, Iparraguirre D, Riofrío O, Salas E.** Género *Satureja* (Lamiaceae) en la etnomedicina andina. Facultad de Biología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2003.
4. **Carhuapoma YM.** Plantas Medicinales Aromáticas Nativas de la Provincia de Huamanga y sus Perspectivas Económicas. UNSCH, Ayacucho; 2002.
5. **Mostacero LJ, Mejia CF, Gamarra TO.** Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Edit. Normas Legales. Trujillo; 2002.
6. **Soto VM.** Estudio fitoquímico y determinación de la actividad analgésica en diferentes extractos de la *Satureja brevicalyx* Epl “wayra muña”. UNSCH, Ayacucho; 1999.
7. **Diez MJ.** Efecto antiespasmódico de la wayra muña *Satureja brevicalyx* Epl sobre intestino aislado de cobayo. UNSCH, Ayacucho; 2002.
8. **Palomino PR.** Efecto antioxidante del extracto acuoso liofilizado de las hojas de la *Satureja brevicalyx* Epl “wayra muña”. UNSCH, Ayacucho; 2005.
9. **Yoshiyama H, Nakazawa T.** Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. Microb Infect 2000;2:55-60. Medline.
10. **Cilley RE, Brighton UK.** The significance of *Helicobacter pylori* colonization of stomach. Semin Pediatric Surg 1995; 4:221-7.
11. **Go MF, Crowe SE.** Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am 2000; 29(3):649-70.
12. **Ibraghimov A, Pappo J.** The immune response against *Helicobacter pylori* – a direct linkage to the development of gastroduodenal disease. Microb Infect 2000;2:1073-7. Medline.
13. **Gamboa FJL.** Infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcerosa péptica. Univ Diag. Holguin 2003; 3(1):20-4.
14. **Rautelin H, Sipponen P, Seppala K, Sarna S, Danielsson D, Kosunen T.** Gastric inflammation and neutrophil-activating and cytotoxin-producing *Helicobacter pylori* strains. Scand J Gastroenterol 1996;92:639-42. Medline.
15. **Suerbaum S, Josenhans C.** Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. Molecular Med Today 1999;5:32-9. Medline.

16. **Saunders CS.** *H. pylori* infection: simplifying management. Patient Care 1999;(20):118-34.
17. **Cover TL, Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* infection. Advances internal medicine. St Luois, Mosby 1996;VI: 85-177.
18. **Surai, P.** Protección antioxidante en el intestino: un buen comienzo es la mitad de la batalla. Centro de investigación de Ciencias Aviar, SAC, Auchincruive. Ayr, Scotland; 2000.
19. **Piñol JF, Paniagua EM.** Cáncer gástrico: factores de riesgo. Rev Cubana de Oncol 1998; 14(3):171-79.
20. **Seddon JM, Ajani VA, Sperduto RD.** Dietary carotenoids, Vit. A, C, and E and advance age-related macular degeneration. JAMA 1994;272:1413-20.
21. **Aejmelaus RT, Holm P, Kauskinen U, et al.** Age related changes in the peroxy radical scavenging capacity of human plasma. Free Rad Biol Med 1997;23:69-75.
22. **Wei YH, Kad SH, Lee HC.** Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletion and lipid peroxidation in human aging. Ann NY Acad Sci 1996;786:23-34.
23. **Luscesoli F, Fraga CG.** Evaluación del estrés oxidativo. Antioxidante y calidad de vida 1995;1:8-13.
24. **Angulo HP, Míguez SM.** Radicales libres, estrés oxidativo y cáncer. Rol de los productos naturales. Edit. Revista de la Academia Peruana de Farmacia XIV:35-50, Perú; 1999.
25. **Obst B, Wagner S, Sewing KF, Beil W.** *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. Oxford Journal Carcinogenesis 2000; 6(21):1111-1115.
26. **Venereo GJ.** Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cubana Médico Militar 2002; 31(2):126-33.
27. **Amie D, Davidovic-Amié D, Beslo D, Trinajstic N.** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Croatica chemical acta CCACAA 2003; 76 (1): 55-56.
28. **Israel DA, Peek RM.** Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15: 1271-90.
29. **Sokol RI, Hoffenberg EI.** Antioxidantes na doença gastrointestinal pediátrica. Clin Ped Am Norte 1997; 8: 457-72.
30. **Drake IM.** Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. Carcinogenesis 1996; 17(3): 559-62.
31. **Halling KC.** Origin of microsatellite instability in gastric cancer. Am J Pthol 1999; 155(1): 205-11.

32. **Gasche C.** Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 7444-8.
33. **Loeb IA.** A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 2001; 61 (8): 3230-9.
34. **Baik SC.** Increased oxidative DNA damage in infected human gastric mucosa. *Cancer Res* 1996; 56:1279-82.
35. **Iaiswal M.** Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res* 2001; 61: 6388-94.
36. **Sepúlveda AR.** Molecular testing of *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis and premalignant gastric lesions. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32(5): 377-82.
37. **Bandoni, A.** Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Edit. UNLP-CYTED. Bs. As.; 2000.
38. **Bruneton, J.** Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2da. Edición. Zaragoza – España: Acribia S.A.; 2001.
39. **Lahlou M.** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *J Phytother Res* 2004; 18:435-448.
40. **Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, et al.** Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *J Helicobacter* 2003; 8(8): 207.
41. **Ramezani M, Khaje-Karamoddin M, Karimi-Fard V.** Chemical composition and anti-*Helicobacter pylori* activity of the essential oil of *Pistacia vera*. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)* 2004; 42 (7): 488-90.
42. **Bergonzelli GE, Donnicola D, Porta N, Cortéis-Theulaz IE.** Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *J Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(10):3240-6.
43. **Mahaboob AS, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasa H, et al.** Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2005; 4: 20

44. **Silva D, Denham E, Faleiro L, Miguel G, Cavaleiro C, Salgueiro L.** Antimicrobial activity of the essential oils of *Dittrichia viscosa subs. viscosa* on *Helicobacter pylori*. Traditional Medicine and Nutraceuticals 2001; 6: 680.
45. **Tzakou O, Skaltsa H.** Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Satureja parnassica subsp. parnassica*. Planta Med. 2003; 69(3):282-4.
46. **Güllüce M, Sökmen M, Deferera D, Agar G, Özkan H, Polissiou M, et al.** In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis*. J. Agric. Food Chem. 2003; 51 (14): 3958-65.
47. **Lagouri V, Blekas G, Tsimidou M, Kokkini S, Boskou D.** Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. J. Food chemistry and Technology 2005; 197 (1): 20-3.
48. **Bezic N, Skocibusic M, Dunkic V.** Antimicrobial effect of *Satureja cuneifolia* Ten essential oil. Acta Botanica Croatica 1999; 58: 99-104.
49. **García BL, García GL, Rojo DD, Sánchez GE.** Plantas con propiedades antioxidantes. Rev Cubana Invest Biomed 2001; 20(3): 231-5.
50. **Ruberto G, Baratta MT.** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. J Food chemistry 2000; 69: 167-174.
51. **Radonic A, Milos M.** Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. J Free Radical Research 2003; 37 (69): 673-679.
52. **Juliani HR, Simon JE.** Antioxidant activity of basil. ASHS Press, Alexandria VA; 2002.
53. **Vasconcellos A.** Alimentos funcionales. Consejos y beneficios para la salud. Depart de Ciencias de Alimentos y Nutrición, Universidad Chapman, California; 2000.

54. **Zygadlo J, Lamarque A, Maestri D, Grosso N.** Empleo de aceites esenciales como antioxidantes naturales. Instituto de la Grasa, Ministerio de Ciencia y Tecnología. España; 1995.
55. **Choi H, Song SH, Ukeda H, Sawamura M.** Radical-Scavenging activities of Citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 4156-4161.
56. **Rekka EA, Kourounakis AP, Kourounakis PN.** Investigation of the effect of chamazulene on lipid peroxidation and free radical proceses. *Rev. Commun Mol Pahtol Pharmacol* 1996; 92 (3): 361 4.
57. **Cadenas E, Packer L.** Handbook of antioxidants. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002.
58. **Ricci D, Fraternale D, Giamperi L, Bucchini A, Epifano F, Burini G, Curini M.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium morum* (Lamiaceae). *J Ethnopharmacology* 2005; 98: 195-200.
59. **Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F, Lagault J.** Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of ***Croton flavens*** L. from Guadeloupe. *J Ethnopharmacology* 2006; 103: 99-102.
60. **Carhuapoma YM.** Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de ***Luma chequen*** (Molina) A. Gray "arrayán". UNMSM, Lima; 2006.
61. **Vallverdú C, Vila R, Tomi F, Carhuapoma M, Casanova J, Cañigüeral S.** Composition of the essential oil from leaves and twigs of ***Luma chequen***. *Flavour Fragr. J.* 2006; 21: 241-43.
62. **CYTED.** Manual de técnicas de investigación. Sub programa X. Química fina farmacéutica. Panamá; 1995.
63. **OECD.** Guideline for testing of chemicals. Organization for economic co-operation and development. Guide No. 425, 2001. Up and down procedure. URL disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso 10 diciembre 2006].

64. **Lagarto PA, Tillan CJ, Vega MR, Cabrera GY.** Toxicidad aguda oral de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales. *Rev. Cubana Plant Med* 1999; 1(4): 26-8.
65. **Cáceres A.** Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. 2da. Edición. Edit. Universitaria San Carlos. Guatemala; 1999.
66. **Li Y, Xu Ch, Zhang Q, Liu JY, Tan RX.** In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 98:329-33.
67. **Tamariz OJ, Capcha MR, Palomino CE, Aguilar OJ.** Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. *Rev Med Hered* 2003; 14:81-88.
68. **Joyeux M, Lobtein A, Antón R, Mortier F.** Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Gingo and some flavonoids. *Planta Med.* 1995; 61: 126-129.
69. **Klein SM, Cohen G, Cederbaum AI.** Production of formaldehyde during metabolismo of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems. *Biochemistry* 1981; 20:6006-6012.
70. **Buege JA, Aust SD.** Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology* 1984; 52:302-10.
71. **Wayne D.** Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta. Edición. Edit. Limusa Wiley. México. D.F.; 2002.
72. **Muñoz AA, Castañeda ML, Blanco KM, Cárdenas C, Reyes J, Kouznetsov V, Col.** Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica* 2007; 33: 125-28.
73. **Nassiff AD, Ricciardi AE, Torres GA, Ricciardi AM.** Contenido en pulegona de la infusión de *Mentha pulegium* L. Comunicaciones científica y tecnológicas, Universidad Nacional del Noreste; 2004.
74. **Kuklinski C.** Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Edit. Omega. Barcelona; 2003.
75. **Hänsel R, Sticher O.** Pharmakognosie – phytopharmazie. 7th edn. Springer-Verlag. Berlin ; 2004.

76. **Moreno MS, Crescente VO, Ortiz MS, Quintero M.** Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de ***Simsia pubescens*** Triana. *Interciencia* 2006; 31(10): 745-47.
77. **Eugenia JB, Tadeo OJ, Muñoz K.** Composición química volátil y toxicidad aguda (CL₅₀) frente a ***Artemia salina*** del aceite esencial del ***Croton malambo*** colectada en la costa norte de Colombia. *Scientia et Technica* 2007; 33: 299-302.
78. **Suarez A, Echando M, Ulate G.** Pharmacological activity of the essential oil of ***Satureja viminea*** (Lamiaceae). *Rev Biol trop Mar* 2003; 51(1): 247-57.
79. **Burzaco VA, Pérez AM, Velasco NA.** Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas mentas con pulegona: ***Mentha pulegium*** L. y ***Mentha cervina*** (L.) Fresen. *BotComplutensis* 1992; 17: 79-85.
80. **Fuertes RC, Munguia ChY.** Estudio comparativo del aceite esencial de ***Minthostachys mollis*** (Kunth) Griseb “Muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación* 2001; 5(1):23-39.
81. **Rodríguez W, Pareja CA, Yushimoto L, Ramirez RA, Gilman R, Watanabe YJ, Col.** Tratamiento del ***Helicobacter pylori*** con omeprazol, amoxicilina y claritromicina en esquemas de 7 y 10 días. *Rev. Gastroenterol Perú* 2003; 23: 117-83.

VIII. ANEXOS



Figura 1. Planta de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña".



Figura 2. Crecimiento en abundancia en laderas naturales de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña".



Figura 3. Ensayos de actividad anti-*Helicobacter pylori* del aceite esencial de *S. brevicalyx*.

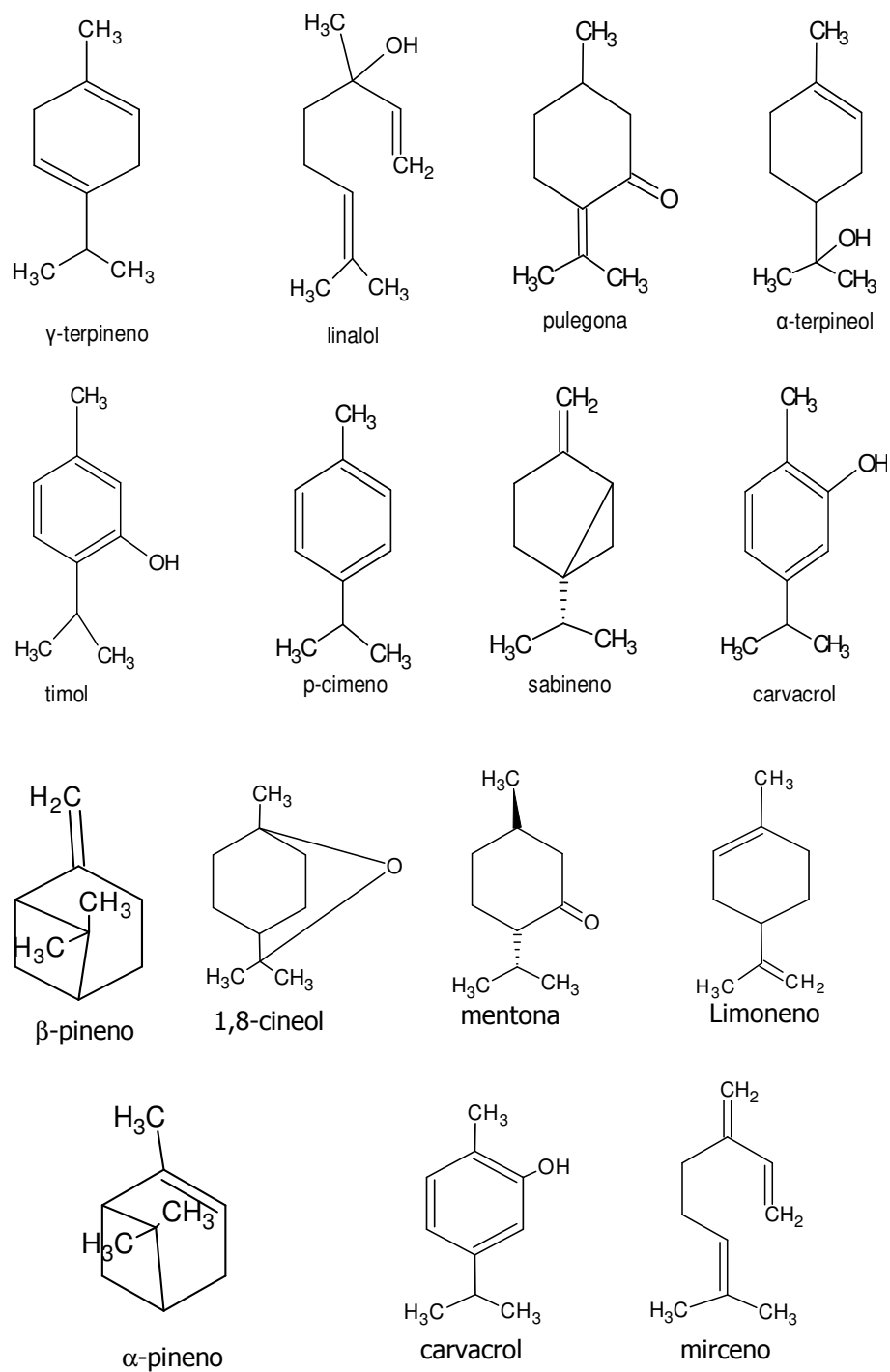


Figura 4. Estructuras químicas de los principales componentes del aceite esencial de *S. brevicalyx*.

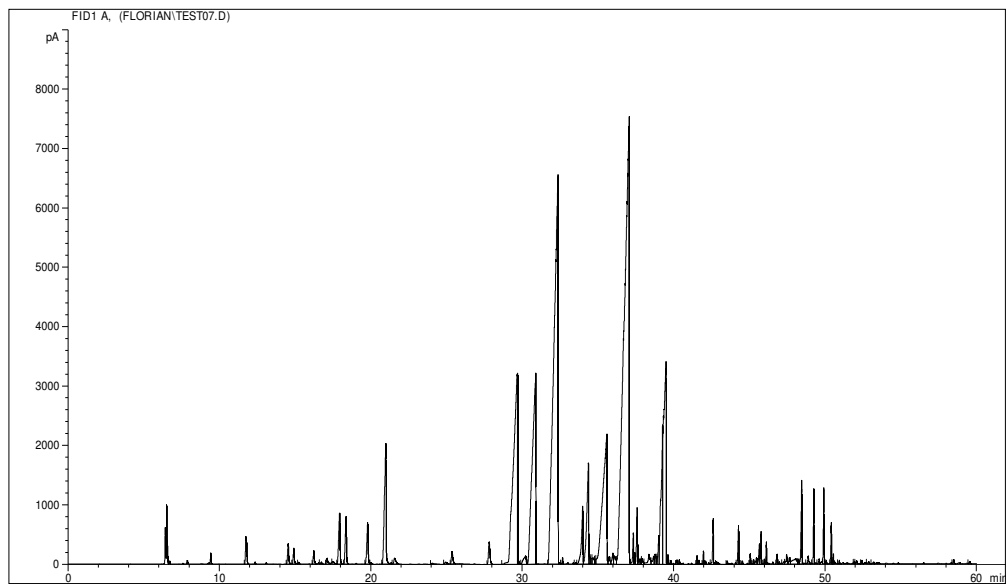


Figura 5. Cromatograma GC-FID del aceite esencial de *S. brevicalyx* en SupelcowaxTM 10 column.

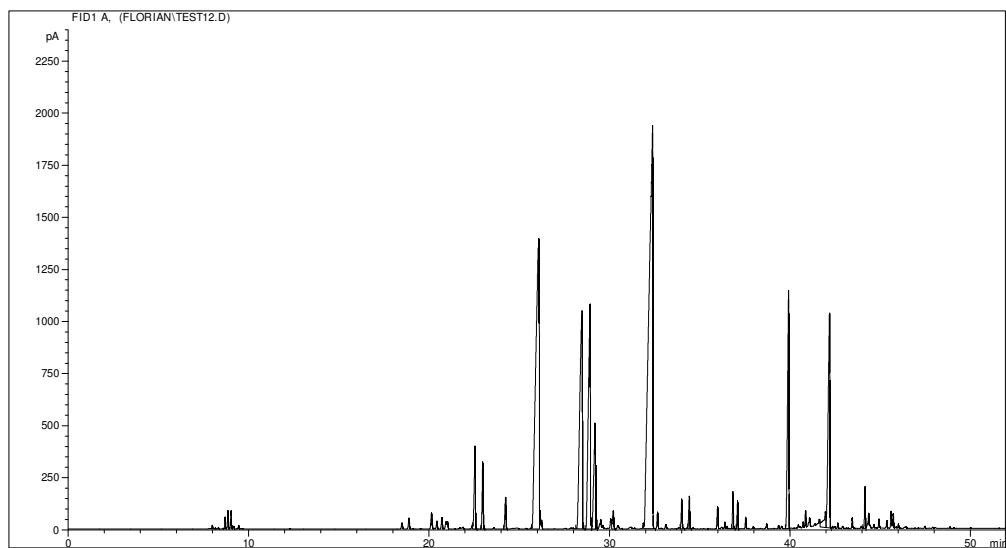


Figura 6. Cromatograma GC-FID del aceite esencial de *S. brevicalyx* en columna de metilsilicona.

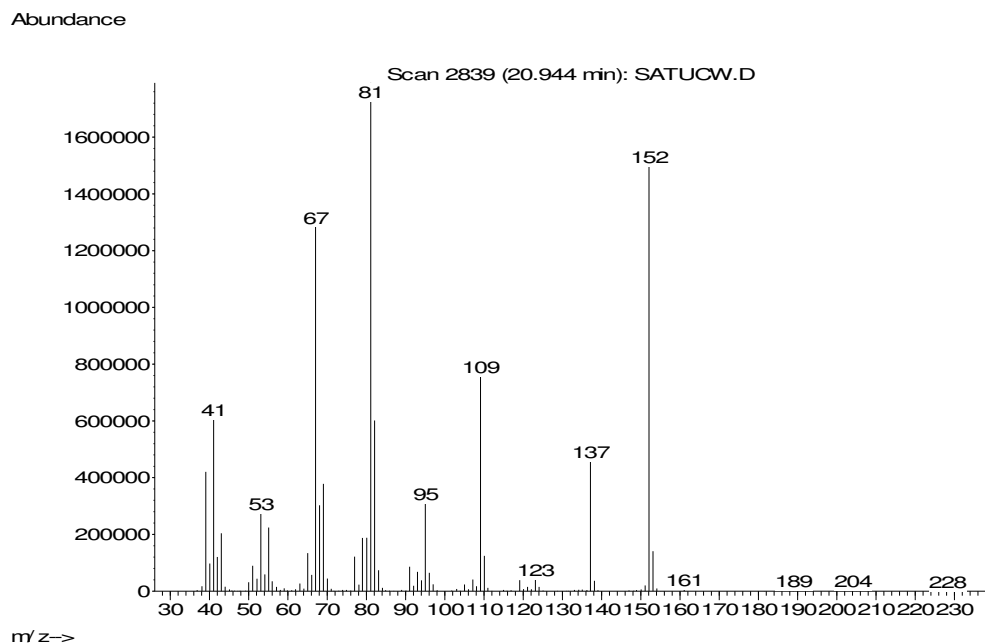


Figura 7. Espectro de pulegona del aceite esencial de *S. brevicalyx*.

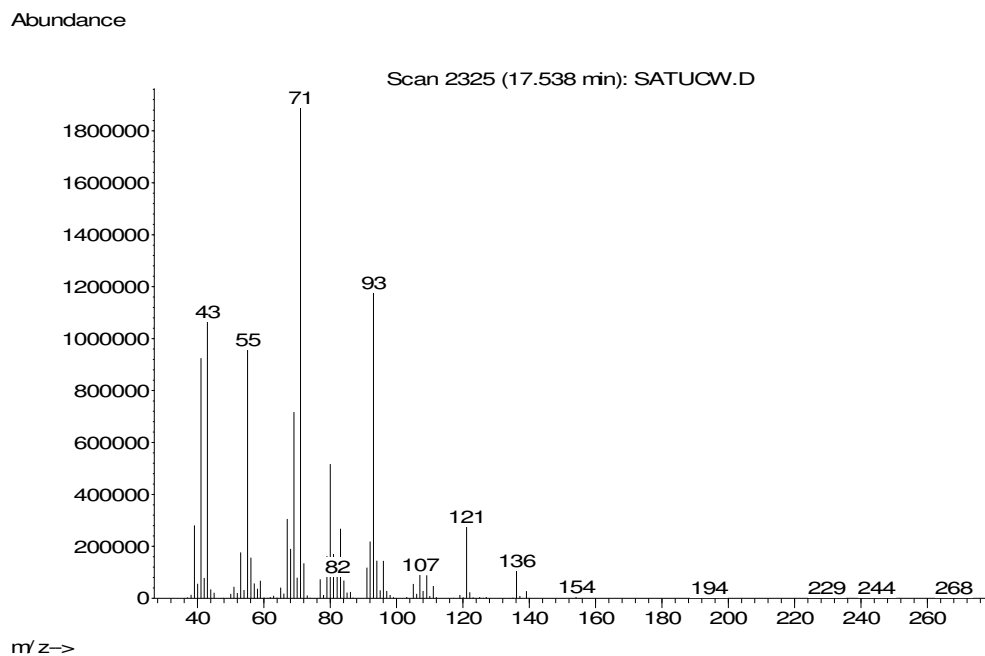


Figura 8. Espectro de linalol del aceite esencial de *S. brevicalyx*.

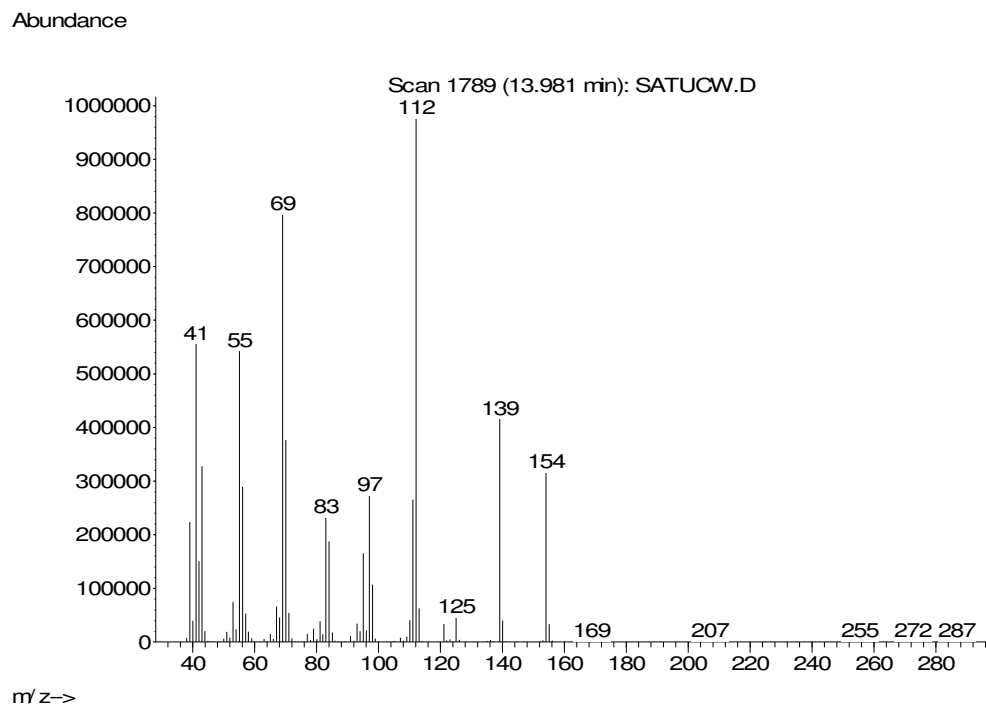


Figura 9. Espectro de mentona del aceite esencial de *S. brevicalyx*.